

**Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie**

**Identifizierung und Charakterisierung  
von Leucin-reichen Repeat (LRR) Proteinen  
von *Listeria monocytogenes* EGD-e  
und deren Regulation**

**Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Justus-Liebig-Universität Gießen**

**Vorgelegt von  
Abdelhak Darbouche  
aus Algerien**

**Gießen 2001**

**Dekan : Prof. Dr. Jürgen Janek**  
**I. Gutachter: PD. Dr. E. Domann**  
**II. Gutachter: Prof. Dr. R. Renkawitz**  
**Externer Prüfer : Prof. Dr. Dr. habil. Hafez Mohamed Hafez**

**Tag der mündlichen Prüfung: 20. 12. 2001**

FÜR MEINE ELTERN  
UND  
MEINE SÖHNE LOTFI UND AMIR

## Publikationen

### Originalarbeiten

Von Both, U., S. Otten, **A. Darbouche**, E. Domann, and T. Chakraborty. (1999). Physical and genetic map of the *Listeria monocytogenes* EGD serotype 1/2a chromosome. FEMS Mikrobiol. Lett. 175: 281-289

Peters, C., Domann, E., **Darbouche, A.**, Chakraborty, T and Mielke, M.E.A. (1999)  
„Immunological characterisation of isogenic *Listeria* mutants that regulate induction of host immune responses”: submitted

**Darbouche, A.**, Zechel, S., Ebel, F., Scheidereit, T., Nichterlein, T., Chakraborty, T., and Domann, E., „Identification of a Beta-glucosidase Gene in *Listeria monocytogenes* EGD and Characterisation of its gene Product”: submitted

### Datenbankeinträge

DNA-Sequenz	<i>inlFDE</i>	AJ012385
DNA-Sequenz	<i>inlG</i>	AJ012386
DNA-Sequenz	<i>bglA</i>	AJ012351

## Tagungsbeiträge

### Posterpräsentation

**Darbouche, A., S. Zechel, T. Nichterlein, T. Scheidereit, S. Otten, T. Chakraborty, and E. Domann:** Identification and characterization of a cryptic gene in *Listeria monocytogenes* with homologies to bacterial glucosidases and galactosidases. 49. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie, **05.-09.10.1997**, Jena



# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1. ZUSAMMENFASSUNG-----</b>	<b>i</b>
<b>2. EINLEITUNG-----</b>	<b>1</b>
2.1 <i>Listeria</i> Allgemein-----	1
2.1.1 Taxonomie und Charakteristika von <i>Listeria</i> spp -----	1
2.1.2 Eigenschaften des fakultativ intrazellulären Erregers <i>L. monocytogenes</i> -----	3
2.1.3 Aufbau und Regulation des Virulenzgenclusters von <i>L. monocytogenes</i> -----	4
2.1.4 Das intrazelluläre Leben von <i>L. monocytogenes</i> -----	7
2.1.5 Immunantworten von Wirts(Zellen) auf eine Listerieninfektion -----	11
2.2 Bekannte Adhäsions- und Invasions-Mechanismen bei Bakterien -----	13
2.2.1 Adhäsine -----	13
2.2.2 Invasine -----	15
2.2.2.1 Trigger- und Zipper-Mechanismus-----	15
2.2.2.2 Bekannte bakterielle Invasionsmechanismen -----	18
2.3 Adhäsion bzw. Invasion des fakultativintrazellulären Bakteriums <i>L. monocytogenes</i> -----	19
2.4 Internalin-Familie in <i>L. monocytogenes</i> -----	24
<b>PROBLEMSTELLUNG UND ZIEL DIESER ARBEIT-----</b>	<b>28</b>
<b>3. MATERIAL-----</b>	<b>30</b>
3.1 Bakterienstämme-----	30
3.2 Zelllinien-----	30
3.3 Oligonukleotide-----	31
3.4 Vektoren-----	32
3.5 Plasmide-----	33
3.6 Chemikalien-----	33
3.7 Enzyme-----	34
3.8 Antikörper-----	34
3.9 Antibiotika und andere Zusätze-----	34
3.10 Medien und Agarplatten-----	34
3.11 Größenmarker-----	36
3.12 Geräte-----	37
3.13 Computerprogramm-----	37
<b>4. METHODEN</b>	
4.1 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen-----	38
4.2 Fällung von DNA mit Ethanol-----	38

4.3	Auftrennen von DNA-Fragmenten durch Agarosegelelektrophorese-----	38
4.4	Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosen-Gelen-----	39
4.5	Ligation von DNA-Fragmenten-----	40
4.5.1	Direkte Klonierung von PCR-Produkten-----	40
4.6	Dephosphorylierung des Klonierungsvektors mit alkalischer Phosphatase -----	41
4.7	Phosphorylierung von PCR-Produkten-----	41
4.8	Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen (nach Hanahan et al., 1991) -----	42
4.9	Transformation von Plasmiden in <i>E. coli</i> -----	42
4.10	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> -----	43
4.10.1	Minipräparation-----	43
4.10.2	Maxipräparation-----	44
4.11	Isolierung von genomischer DNA aus Listerien-----	44
4.12	RNA-Isolierung aus Listerien mit RNeasy Midikit von Quiagen-----	45
4.13	Alkalischer Northern-Transfer von RNA-Fragmenten auf Nylonmembranen-----	46
4.13.1	Vorbereitung des Gels und der Membran-----	46
4.13.2	Transfer der RNA-Fragmente auf Nitrozellulosefilter (monodirektionaler Blot)-----	47
4.13.3	Hybridisierung der RNA mit nicht-radioaktiv markierten Sonden-----	48
4.13.3.1	Hybridisierung mit DIG-markierten Sonden und immunologischer Nachweis -----	48
4.13.4	RNA Dot-Blot-----	50
4.14	Herstellung von Listerien-Protoplasten-----	50
4.15	Transformation von Listerien-Protoplasten-----	51
4.16	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR= Polymerase Chain Reaction)-----	51
4.16.1	PCR-----	52
4.16.2	Amplifizierung von DNA-Fragmenten mittels Expand PCR-System High Fidelity-----	53
4.16.3	PCR mit DIG-Einbau -----	53
4.16.4	Inverse PCR-----	54
4.17	Spektrophotometrische Bestimmung von Nukleinsäuren mit GeneQuant-----	55
4.18	Automatische DNA-Sequenzierung -----	55
4.18.1	Sequenziergel und Laufparameter-----	55
4.18.1.1	„Cycle Sequencing“ mit Cy5-Fluoreszenz-markierten Oligonukleotiden-----	55
4.18.1.2	Sequenzierung von Plasmiden mit unmarkierten Primern-----	56
4.19	Herstellung chromosomaler Deletionsmutanten in <i>L. monocytogenes</i> -----	56
4.20	Aufbereiten von Listerien-Kulturen-----	59
4.20.1	Präparation von Überstandsproteinen-----	59
4.20.2	Herstellung von SDS-Extrakten-----	59
4.21	Aufbereitung von <i>E. coli</i> -Kulturen-----	59
4.21.1	Herstellung von Zytoplasma-Extrakten-----	59
4.22	Auftrennen von Proteinen mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese -----	59
4.23	Transfer von Proteinen auf Nitrocellulosefilter (Western-Blot) -----	61
4.24	Färbung des Nitrocellulosefilters mit Ponceau-S-----	62
4.25	Entwicklung des Westernblot-Nitrocellulosefilters mit Antikörpern-----	62
4.26	Expression und Aufreinigung von Proteinen durch „Glutathion-S-Transferase (GST)Gen-Fusionssystem“	63

4.26.1	Induktion und Überexpression -----	63
4.26.2	Cytoplasmaextraktion bzw. Reinigung des GST-Fusionsproteins-----	63
4.27	Proteinbestimmung mittels den BCA-Assay von Pierce-----	64
4.28	Enzymaktivitätsnachweis in <i>L. monocytogenes</i> (β-Galactosidase-Aktivität) -----	65
4.29	Infektionsversuch von eukaryotischen Zelllinien mit Listerien-----	66
4.30	Immunofluoreszenzfärbung-----	67
4.31	Mausinfektion-----	67
4.32	Herstellung polyklonaler Antikörper-----	68
4.33	Bestimmung der optischen Dichte einer Bakterienkultur-----	68
4.34	Anlegen von Glycerinkonserven-----	68
<b>5.</b>	<b>ERGEBNISSE-----</b>	<b>69</b>
 <b>TEIL I: Identifizierung und Charakterisierung neuer LRR-Proteine aus <i>L. monocytogenes</i> EGD-e:</b>		
	<b>der <i>inlFDE</i>-Locus und das <i>inlG</i>-Gen-----</b>	<b>69</b>
5.1	Klonierung und Sequenzierung des <i>inlFDE</i> -Locus und dessen flankierender Bereiche-----	69
5.1.1	Sequenzanalyse des <i>inlFDE</i> -Locus und der Genprodukte-----	70
5.2	Klonierung und Sequenzierung des <i>inlG</i> -Genes-----	74
5.3	Homologieanalyse der Gene <i>inlF</i> , <i>inlD</i> , <i>inlE</i> und <i>inlG</i> und deren Genprodukten-----	75
5.4	Phylogenetischer Baum der verschiedenen Internaline von <i>L. monocytogenes</i> -----	76
5.5	Darstellung der Internalin-Familie in <i>Listeria monocytogenes</i> EGD-e-----	77
5.6	Nachweis der <i>inlF</i> , D, E und G-Transkripte durch RNA-DNA-Hybridisierung (Northern-Blot)-----	82
5.7	Herstellung von chromosomaler „in frame“ Deletionsmutanten im <i>inlFDE</i> -Locus-----	83
5.8	Infektionsversuche und Immunfluoreszenzfärbung mit Listerien-Stämmen -----	85
5.8.1	Zellinfektion-----	85
5.8.2	Immunfluoreszenzfärbung -----	85
5.8.3	Mausinfektion-----	86
5.9	Promotoraktivitätsnachweis von <i>inlF</i> , D, E und G in <i>L. monocytogenes</i> EGD-e-----	87
5.9.1	Klonierung der putativen regulatorischen Regionen der <i>inlF</i> , <i>inlD</i> , <i>inlE</i> und <i>inlG</i> -----	87
5.9.2	Nachweis einer Beta-Galactosidase-Aktivität aus Listerien-----	89
5.10	Reinigung von <i>InlF</i> , D und E mit Hilfe eines <i>in vitro</i> Proteinexpressionssystems -----	90
5.10.1	Klonierung von Internalinen (ohne Signal-Peptide) in den Vektor pGEX-----	90
5.10.2	Expression der klonierten <i>inl</i> -Genprodukte-----	91
5.10.3	Aufreinigung der GST-Internalin-Fusionsproteine-----	91
5.10.4	Immunobiochemischer Nachweis von <i>InlF</i> , D und E mit Polyklonalantikörpern-----	92
5.11	Der <i>inlFDE</i> -Locus und flankierende Bereiche in <i>L. monocytogenes</i> EGD-e und <i>L. innocua</i> -----	94
5.11.1	Der <i>inlFDE</i> -Locus und flankierende Gene <i>ascB</i> und <i>dapE</i> in <i>L. innocua</i> -----	94
5.11.2	Herstellung einer <i>dapE</i> -Deletionsmutante-----	96
5.12	Herstellung von NotI-Deletionsmutanten zur Kartierung des Listerien-EGD-e-Genoms -----	97

<b>TEIL II: Regulation des <i>inlAB</i>-Locus</b>	<b>99</b>
5.13 Herstellung von Deletions bzw. Substitutionsmutanten in der <i>PprfA</i> -Box des <i>inlAB</i> -Operons	99
5.13.1 Deletion der 12 Basenpaare langen <i>PprfA</i> -Box im Promotor des <i>inlAB</i> -Operons	99
5.13.2 Substitution der 12 Basenpaare langen <i>PprfA</i> -Box im Promotor des <i>inlAB</i> -Operons	101
5.14 Immunobioschemische Untersuchung der $\Delta PprfA$ - bzw. Subst. <i>PprfA</i> -Box-Mutante	103
5.15 Nachweis der <i>inlAB</i> -Transkripte in verschiedenen Listerien-Stämmen mittels RNA-DNA Hybridisierung (Northern-Blot)	104
5.16 Nachweis der <i>inlAB</i> -Transkriptintensität der verschiedenen Listerien-Stämme Mittels mittels Dot-Blot-Methode	105
5.17 Infektionsversuche am Zellkulturmodell	106
<b>6. DISKUSSION</b>	<b>109</b>
<b>7. LITERATUR</b>	<b>129</b>
<b>8. ANHANG</b>	<b>138</b>
8.1 Gesamte Sequenz des <i>inlFDE</i> -Locus in <i>L. monocytogenes</i> EGD-e	138
8.2 Gesamte Sequenz des <i>inlG</i> -Genes in <i>L. monocytogenes</i> EGD-e	150
8.3 Gesamte Sequenz der intergenische Region zwischen den <i>ascB</i> - und <i>dapE</i> -Gene bei <i>Listeria innocua</i>	155
8.4 Promotor-Region des <i>inlA</i> -Genes in <i>L. monocytogenes</i> EGD-e	157
8.5 Allignmentanalyse (Clustal) alle bis jetzt bekannte Internalinproteinen innerhalb <i>Listeria monocytogene</i>	158
8.6 Merkmale der Internaline	162
8.7 Abkürzungen	169
8.8 Symbole für Aminosäuren	171
8.9 Der genetische code	171
8.10 Vektoren	172

## 1. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurden neue Leucin-reiche Repeat (LRR) Proteine des humanpathogenen Bakteriums *Listeria monocytogenes* identifiziert und unter Anwendung molekularbiologischer, zellbiologischer und infektiologischer Methoden näher charakterisiert (Teil I). Weiterhin wurde die Transkriptionsregulation des an der Invasion beteiligten Internalin-Operons, bestehend aus den LRR-Proteinen InlA und InlB, durch die Herstellung gezielter chromosomaler Deletionsmutanten molekularbiologisch genauer analysiert (Teil II).

Die neu identifizierten LRR-Proteine InlF, InlD und InlE besitzen jeweils eine Länge von 1473 bp (490aa), 1647 bp (548aa) und 1500 bp (499aa) und sind physikalisch auf dem listeriellen Genom miteinander verbunden. Nach jedem der drei Gene ist ein Transkriptionsterminator zu finden, sodaß die Gene monocistronisch transkribiert werden. Flankiert werden die Gene *inlFDE* von den sogenannten Haushaltsgenen 6-Phospho- $\beta$ -Glukosidase (*ascB*) und einer Succinyl-Diaminopimelat-Desuccinylase (*dapE*). Ein weiteres LRR-Protein, InlG, wurde, angelehnt an die Sequenz des Genes aus einem anderen *L. monocytogenes*-Stamm, ebenfalls kloniert. Es konnten keine Sequenzunterschiede zu dem in dieser Arbeit verwendeten Stamm EGD-e gefunden werden.

*L. innocua* ist mit *L. monocytogenes* sehr eng verwandt und unterscheidet sich vor allem durch das Fehlen der bekannten Pathogenitätsfaktoren Hly, PlcA/B, Mpl, ActA, InlA/B, IrpA und deren Transkriptionsregulator PrfA. Durch eine spezifische PCR mit Oligonukleotiden, die in den flankierenden Genen *ascB* und *dapE* binden, konnte gezeigt werden, dass das *inlFDE*-Gencluster in *L. innocua* nicht vorhanden ist. Somit handelt es sich bei diesem Gencluster um eine weitere, neu entdeckte *L. monocytogenes*-spezifische Determinante.

Durch Analyse der Aminosäuresequenzen der Genprodukte InlFDE konnte gezeigt werden, dass die drei Proteine der Familie der LRR-Proteine von *L. monocytogenes* zuzuordnen sind. Sie besitzen ebenfalls ein N-terminales Signalpeptid, eine ca. 50 bp große Spacer-Region, eine unterschiedliche Anzahl Leucin-reicher Repeats (InlF = 6; InlD und InlE = 8¾ von in der Regel jeweils 22 Aminosäuren Länge, eine zweite Repeat-Region und einen C-terminalen Membrananker.

Die transkriptionelle Regulation der Gene *inlFDE* und InlG wurde mittels Transkriptionsstudien untersucht. In Northernblot-Analysen konnte gezeigt werden, dass nur bei InlD eine monocistronische mRNA vorhanden ist. Die Gene *inlFE* und InlG wurden unter

den angewandten experimentellen Bedingungen nicht transkribiert. Es konnte auch gezeigt werden, dass die Regulation des *InlD*-Gens Temperatur-unabhängig erfolgt: Ein Transkript wurde bei 4°C, 20°C und 37°C in gleicher Menge nachgewiesen.

Die durch diese Analysen erzielten Ergebnisse konnten durch Reporteranalysen bestätigt werden. Hierzu wurden die 5'-Sequenzen mit den putativen Promotoren der Gene *inlFDE* und *inlG* in einen Vektor mit dem Beta-Glukosidasegen aus *Bacillus stearothermophilus* als eine Transkriptionsfusion kloniert und in rekombinanten *L. monocytogenes* untersucht. In der Tat konnte auch hier nur bei dem Konstrukt mit dem *inlD*-Promotor eine Beta-Glukosidase-Aktivität nachgewiesen werden.

Um einen möglichen Beitrag der Genprodukte *InlFDE* zur Pathogenität und/oder Virulenz von *L. monocytogenes* zu zeigen, wurden stabile chromosomale Deletionsmutanten ohne polare Effekte in *L. monocytogenes* EGD-e hergestellt. Es wurden sowohl die einzelnen Gene *inlF*, *inlD*, *inlE* als auch das gesamte Gencluster *inlFDE* deletiert und die isogenen Deletionsmutanten in Zellkulturversuchen und im Mausinfektionsmodell untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die Gene *inlFDE* nicht an der Invasion von Caco-2 und HeLa Zellen beteiligt sind. Der Infektionszyklus in diesen Wirtszellen unterscheidet sich auch nicht zum Wildtyp, was durch Immunfluoreszenzfärbungen gezeigt werden konnte. Allerdings konnte eine Auswirkung der Deletion des *inlD*-Gens in Mäusen gezeigt werden. Nach intravenöser Applikation der *inlD*-Mutanten wurden diese Bakterien in Leber und Milz der infizierten Mäuse in signifikant geringeren Mengen im Vergleich zum Wildtyp gefunden. Dies bedeutet, dass zumindest dem *InlD*-Genprodukt eine Rolle in der Pathogenität von *L. monocytogenes* (in vivo) zuzuordnen ist.

Für Proteinanalysen wurden die Gene *inlF/D/E* im Gluthation S-Transferase System rekombinant gereinigt. Mit den gereinigten Proteinen wurden Kanincheseren hergestellt und für immunbiochemische Nachweise von Überstands- und Zellwandproteinen aus *L. monocytogenes* EGD-e eingesetzt.

Im Rahmen des Genomprojektes zur Sequenzierung und Kartierung des Genoms von *L. monocytogenes* EGD-e am Institut für Medizinische Mikrobiologie in Gießen wurden in bekannten Pathogenitätsfaktoren auf dem Genom Deletionen mit einer NotI-Restriktionsschnittstelle hergestellt. Diese Mutanten wurden zur NotI-Kartierung von *L. monocytogenes* EGD-e verwendet und ermöglichten eine Sequenz-unabhängige Lokalisation der Pathogenitätsfaktoren auf dem Genom des Bakteriums.

Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit sollte die Regulation des *inlAB*-Operons, die PrfA-abhängig und PrfA-unabhängig erfolgt, genauer untersucht werden. Hierzu wurde die *prfA*-Box vor den Genen *inlAB* zum einen chromosomal deletiert und zum anderen durch eine gleich lange, nicht identische Sequenz chromosomal substituiert. Durch immunbiochemische Analysen und Northernblot-Studien konnte gezeigt werden, dass die Gene *inlAB* beim Wildtyp EGD-e und bei der Deletionsmutante  $\Delta prfA2$  in gleichem Maße transkribiert und translatiert werden, während bei den Mutanten mit der *prfA*-Box-Deletion und -Substitution nur sehr geringe Mengen an Transkript und Protein vorhanden waren. Diese Ergebnisse deuten eindeutig darauf hin, dass es einen von PrfA unabhängigen Transkriptionsregulator des *inlAB*-Operons geben muss. In Zellkulturversuchen mit Caco-2 und HeLa Zellen konnte gezeigt werden, dass Stämme, die in ihrer vor dem *inlAB*-Operon liegenden *PrfA*-Box mutiert sind, genau wie Stämme mit einer Deletion im *inlAB*-Operon, nicht invadieren.

## 2. EINLEITUNG

### 2.1 *Listeria* allgemein

#### 2.1.1 Taxonomie und Charakteristika von *Listeria* spp.

Listerien wurden erstmals im Jahre 1926 durch Murray et al. als Erreger einer ausgeprägten Mononukleose bei Kaninchen und Meerschweinchen beschrieben. Im Jahre 1929 konnte *Listeria monocytogenes* (damals noch *Bakterium monocytogenes*) aus Blut eines Patienten, der eine Mononukleose-ähnliche Erkrankung zeigte, isoliert werden. Erst im Jahre 1953 wurde der Zusammenhang zwischen der fehlverlaufenden Schwangerschaft einer Mutter mit Zwillingen und einer Listerien bedingten Mastitis bei einer Kuh (Konsum von Rohmilch) erkannt und auf eine Infektion mit *L. monocytogenes* zurückgeführt. In den folgenden Jahren waren Listerien öfters Ursache lokal gehäufte Erkrankungen beim Menschen, was sich schließlich in entsprechenden Verordnungen im Lebensmittelbereich manifestierte. Obwohl Listerien ubiquitär vorkommen, ist die Anzahl der gemeldeten Listeriosefälle beim Menschen über die Jahre gesehen ausgesprochen gering. Wird eine Listeriose aber im entscheidenden Moment nicht als Differentialdiagnose in Betracht gezogen, so stellen sich oft fatale Folgen ein. Listerien gehören zu den Gram-positiven (in älteren Kulturen auch Gram-labilen), beweglichen, aerob bis fakultativ anaeroben, sowie nicht sporenbildenden Bakterien. Aus pathophysiologischer Sicht zeichnen sie sich insbesondere durch einige ungewöhnliche Eigenschaften aus. So besitzen sie die Fähigkeit - welche bei pathogenen Mikroorganismen selten beobachtet wird - bei tiefen Temperaturen (circa 4°C) zu wachsen und hohe Salzkonzentrationen sowie einen weiten pH-Bereich zu tolerieren. Schließlich handelt es sich um einen Erreger, der auch in der Lage ist, intrazellulär zu überleben.

Zur Gattung *Listeria* werden heute die Arten *L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. innocua*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri* und *L. grayi* gerechnet.

*L. monocytogenes* ist human- und tierpathogen, während *L. ivanovii* nur tierpathogen ist und vor allem bei Schafen auftritt. Aufgrund von taxonomischen und chemischen Untersuchungen sind Listerien in die *Lactobacillus* und *Bacillus* Untergruppe einzuordnen. Die am nächsten verwandte Bakteriengattung ist *Brochotrix* (Seeliger et Jones, 1986).

*L. grayi*-Stämme unterscheiden sich von den anderen Arten dadurch, dass sie zur Fermentation von Mannitol, Gluconat und zu Nitratreduktion befähigt sind (Rocourt et Catimel, 1985).

*L. monocytogenes* ist  $\beta$ -hämolytisch auf Blutagar und formt relativ kleine Hämolyse-Zonen um die Kolonien. *L. ivanovii* erzeugt wegen einer Phospholipase-Aktivität doppelt bis dreimal so große Höfe auf Pferde- oder Schafblutagar, andere Listerienarten sind nicht hämolytisch



(Schuchat, 1991). Listerien differenzieren sich u. a. durch CAMP (Christie-Aktins-Munch-Peterson)-Aktivität und durch die Fähigkeit, verschiedene Zucker zu verwerten (Rocourt, 1983).

Eine weitere Unterscheidung der Listerien erfolgt durch Feintypisierung: Die einzelnen Stämme können noch durch Serotypisierung und durch molekularbiologische (RAPD; PCR) Methoden individuell typisiert werden. Die Bestimmung des Serovars stellt eine ergänzende Methode zur Identifizierung der einzelnen Spezies dar und basiert auf Agglutinationstests mit „O“ (Somatischen) und „H“ (Flagella) Antigenen (Seeliger et Jones, 1991). So sind die Serotypen 1/2a, 1/2b und 4b bei humanen Listerieninfektionen am häufigsten beteiligt (Faber et Peterkin, 1991).

**Tab. 1:** Serologische Typisierung der Listerienarten (nach BILLE (J.), ROCOURT (J.) et SWAMINATHAN (B.) : *Listeria*, *Erysipelothrix*, and *Kurthia*. In: P.R. MURRAY, E.J. BARON, M.A. PFALLER, F.C. TENOVER et R.H. YOLKEN (ed.) : Manual of Clinical Microbiology, 7th edition, ASM Press, Washington, D.C., 1999, pp. 346-356. SEELIGER (H.P.R.) et JONES (D.) : Genus *Listeria* Pirie 1940, 383AL. In : P.H.A. SNEATH, N.S. MAIR, M.E. SHARPE and J.G. HOLT (ed.) Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, vol. 2, The Williams & Wilkins Co., Baltimore, 1986, pp. 1235-1245.

Spezies	Serovar	Antigen O	Antigen H
<i>L. monocytogenes</i> , <i>L. seeligeri</i>	1/2a	A B	I II (III)*
<i>L. monocytogenes</i> , <i>L. seeligeri</i> , <i>L. welshimeri</i> .	1/2b	A B C	I II (III)
<i>L. monocytogenes</i> , <i>L. seeligeri</i> .	1/2c	B D	I II (III)
<i>L. monocytogenes</i>	3a	A B	II (III) IV
<i>L. monocytogenes</i>	3b	A B C	II (III) IV (XII) (XIII)
<i>L. monocytogenes</i>	3c	B D	II (III) IV (XII) (XIII)
<i>L. monocytogenes</i>	4a	A B C	(III) V VII IX
<i>L. innocua</i> , <i>L. monocytogenes</i> .	4ab	A B C	(III) V VI VII IX X
<i>L. monocytogenes</i> , <i>L. seeligeri</i> .	4b**	A B C	(III) V VI
<i>L. monocytogenes</i> , <i>L. welshimeri</i> .	4c***	A B C	(III) V VII
<i>L. monocytogenes</i> , <i>L. seeligeri</i> .	4d	A B C	(III) (V) VI VIII
<i>L. monocytogenes</i>	4e	A B C	(III) V VI (VIII) (IX)
<i>L. ivanovii</i> .	5	A B C	(III) (V) VI (VIII) X
<i>L. monocytogenes</i>	7	A B C	(III) XII XIII
<i>L. innocua</i> , <i>L. welshimeri</i>	6a	A B C	(III) V (VI) (VII) (IX) XV
<i>L. innocua</i> , <i>L. seeligeri</i> , <i>L. welshimeri</i> .	6b	A B C	(III) (V) (VI) (VII) IX X XI
<i>L. grayi</i>		E	(III) XII XIV

\* : ( ) : Antigen kann abwesend sein; \*\* : Einige Stämme des Serovars 4b besitzen das IX-Antigen.

1987 hat McLauchlin einen außergewöhnlichen Stamm des Serovars 4b isoliert, dessen antigenische Formel wie folgt dargestellt: (III) V VI VII A B C ; \*\*\* : nach Seeliger et Jones 1991, einige Stämme von *L. seeligeri* gehören zum Serovar 4c.

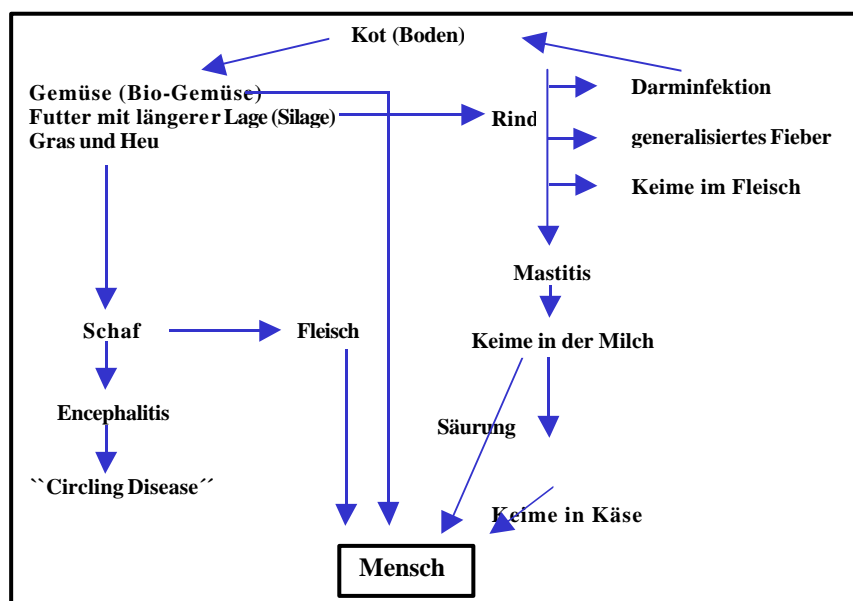
Mit Ausnahme der Serovar 5-Stämme (*L. ivanovii*) besteht jedoch kein Zusammenhang zwischen dem Serovar und der Spezies (Jones et Seeliger, 1992)

### 2.1.2 Eigenschaften des fakultativ intrazellulären Erregers *L. monocytogenes*

Infektionen des Menschen mit *Listeria monocytogenes* werden eindeutig auf den Verzehr kontaminierter Lebensmittel zurückgeführt. Ein breites Spektrum an Lebensmitteln, überwiegend tierischer, aber auch pflanzlicher Herkunft, wurde als Ursache für Einzelfälle oder Ausbrüche von Erkrankungen ermittelt. So wurde einer der ersten erfassten größeren Listerioseausbrüche in Kanada durch Krautsalat verursacht (1981 mit 41 Fällen). In jüngster Zeit sind innerhalb der Europäischen Union Erkrankungsfälle u. a. in Zusammenhang mit dem Verzehr verschiedener Weichkäsesorten aus Rohmilch bekannt geworden. Presseberichte darüber haben zur Beunruhigung in der Bevölkerung geführt (bgvv, 1999).

Bei *L. monocytogenes* handelt es sich um zarte, peritrich begeißelte, bei 20°C gut bewegliche, grampositive Stäbchen, die aerob auf Blutagar kultiviert werden können. Nach Bebrütung über Nacht entstehen kleine, graue Kolonien, die von einer leichten Hämolysezone, hervorgerufen durch das Listeriolysin O, umgeben sind. Listerien können sich auch noch bei 5-10°C vermehren (Kayser, 1993).

Der Keim ist nicht nur an Mensch oder Tier adaptiert, sondern auch an die Umwelt (Weber, 1991)



Listerien müssen als für den Menschen fakultativ pathogene Erreger (Opportunisten) angesehen werden. Infektionen entstehen, wenn eine große Zahl dieser Erreger ( $10^6$ - $10^9$ ) mit Nahrungsmitteln in den Gastrointestinaltrakt gelangen (Kayser, 1993).

Bei Immunkompetenten verläuft eine Infektion mit *L. monocytogenes* oft nur als stumme Infektion (Weber, 1991), bei Immungeschwächten (Personen mit T-Zell-Defekten und Malignomen, Alkoholiker, Diabetiker, bei Cortisontherapie, in der Schwangerschaft, im hohen Alter oder bei Säuglingen) aber manifestiert sich eine Listeriose als primäre Septikämie und/oder Meningoenzephalitis. Selten ist die Listerienendokarditis (Kayser, 1993).

Die konnatale Listeriose ist durch eine Septikämie mit multiplen Abszessen und Granulomen in den verschiedensten Organen des Neugeborenen charakterisiert (= *Granulomatosis infantiseptica*) (Kayser, 1993).

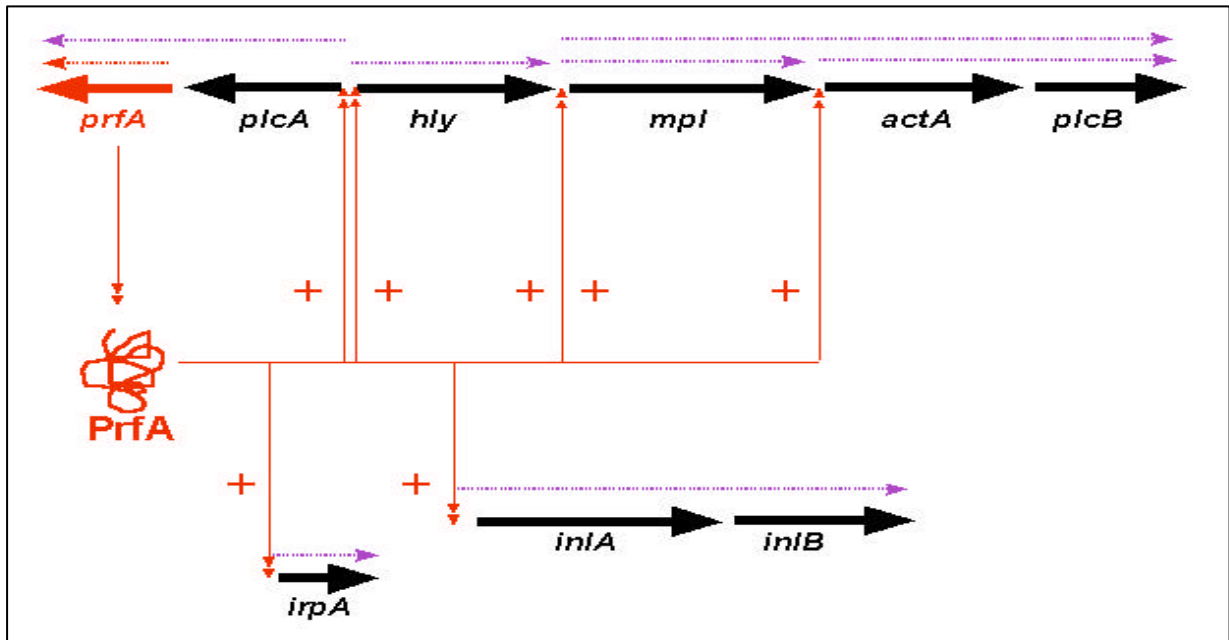
Diese Erkrankung besitzt eine Mortalitätsrate von bis zu 70% (Seeliger, 1961). Die Inkubationszeit kann stark variieren, von 1-3 Tagen bis zu Wochen (Kayser, 1993).

Zur Therapie sind Aminopenicilline (Ampicillin) die Mittel der Wahl. Auch die Ureidopenicilline sind wirksam. In schweren Fällen sollte bei Therapie ein Aminopenicillin mit einem Aminoglycosid kombiniert werden. Bei Penicillinallergie kann mit Trimethoprim/Sulfamethoxazol (TMP/SMZ) behandelt werden. Die Dauer der Behandlung richtet sich nach dem Krankheitsbild. Sie sollte bei Enzephalitis sechs Wochen betragen (Hahn et al., 2000)

### 2.1.3 Aufbau und Regulation des Virulenzgenclusters von *L. monocytogenes*

Die Faktoren, die hauptsächlich an der Virulenz von *L. monocytogenes* beteiligt sind, sind auf dem Genom in einem Cluster aus 5 Genen angeordnet, *plcA* (Phosphatidylinositol-spezifische Phospholipase C-Gen), *hly* (Hämolysin-Gen), *mpl* (Metalloprotease-Gen), *actA* (Aktinfilament akkumulierendes-Gen) und *plcB* (Phosphatidylcholin-spezifische Phospholipase C-Gen) (Abb.1).

Dieses Gencluster startet mit einem Gen, das für den Transkriptionsaktivator PrfA (positive regulatory factor) kodiert, der die Expression dieser Gene positiv reguliert und zur CAP/FNR-Familie gehört. Eine Mutation innerhalb eines dieser 5 Gene kann die Virulenz des Bakteriums in unterschiedlichem Ausmaße reduzieren (Goebel et al., 1993).



**Abb. 1:** Chromosomales Virulenzgencluster von *L. monocytogenes* sowie *inlAB*-Operon und *irpA*-Gen von *L. monocytogenes*. Das Virulenzgencluster enthält das Gen für den positiven Regulator PrfA, von dem die Expressionen der Gene für Listeriolysin (*hly*), die beiden Phospholipasen (*plcA* und *plcB*), die Metalloprotease (*mpl*) und *actA* kontrolliert werden. Das Gencluster unterteilt sich in zwei unterschiedliche Operons: (1) *plcA*–*prfA* und (2) *mpl*–*actA*–*plcB* (nach Portnoy et al., 1992). *inlAB*-Operon ist teilweise PrfA reguliert, *irpA* ist PrfA reguliert!  
 PrfA-abhängige Transkription

Von den bisher 8 bekannten, durch PrfA regulierten Virulenzgenen (*plcA*, *hly*, *mpl*, *actA*, *plcB*, *inlA*, *inlB*, *irpA*), liegen die ersten fünf in einem Gencluster, während die restlichen drei an anderen Stellen des listeriellen Genoms lokalisiert sind und erst kürzlich durch die Zusammenarbeit mit Ulrich von Both auf dem Chromosom kartiert wurden (Von Both et al., 1999).

Verschiedene Hinweise deuten auf die Bedeutung von PrfA als ein DNA-bindendes Protein hin. Viele DNA-bindende Proteine erkennen spezifische DNA-Sequenzen durch genau definierte Funktionsbereiche, der sog. DNA-Bindungsdomäne. Die DNA-bindenden Proteine falten sich dabei so, dass bestimmte Strukturen aus dem Molekül herausragen, oder sie enthalten flexible Oberflächenstrukturen, die mit den Basen der DNA in Kontakt treten können.

Die Aminosäuresequenz des PrfA weist im Bereich der Aminosäuren 133-152 ein Helix-Turn-Helix-Motiv auf (Freitag et al., 1992), was auf ein DNA-bindendes Protein hinweist. Das Helix-Turn-Helix-Motiv wurde sowohl in prokaryotischen als auch in eukaryotischen DNA-Bindungsproteinen beschrieben. Beispiele für prokaryotische DNA-Bindungsproteine, welche ein Helix-Turn-Helix-Motiv aufweisen, sind das „catabolite gene activator protein“ (CAP) (Mc Kay et Steitz, 1981), der Lambda Repressor (Pabo et Lewis, 1982) und das Cro-Protein des Lambda Phagen (Anderson et al., 1981). Weiterhin ist eine Palindromsequenz in

den Promotorbereichen der jeweiligen Virulenzgene als potentielle DNA-Bindungsstelle des PrfA-Polypeptides zu finden (Freitag et al., 1992).

T	T	A	A	C	A	A	A	T	G	T	T	A	G	<i>actA</i>
T	T	A	A	C	A	T	T	T	G	T	T	A	A	<i>plcA</i>
T	T	A	A	C	A	A	A	T	G	T	A	A	A	<i>hly</i>
T	T	A	A	C	A	A	A	T	G	T	T	A	A	<i>mpl</i>
A	T	A	A	C	A	T	A	A	G	T	T	A	A	<i>inlA</i>
T	T	A	A	C	G	C	T	T	G	T	T	A	A	<i>irpA (inlC)</i>
T	T	A	A	C	A	A	A	T	G	T	T	A	A	<i>ivanovii-actA</i>
T	T	A	A	C	A	A	A	T	G	T	T	A	A	<i>ivanovii-plcA</i>
T	T	A	A	C	A	T	T	T	G	T	T	A	A	<i>ivanovii-ilo</i>
T	T	A	A	C	A	A	A	T	G	T	T	A	A	<i>ivanovii-mpl</i>
T	T	A	A	C	G	C	T	T	G	T	T	A	A	<i>ivanovii-inlC</i>
T	T	A	A	C	T	T	T	T	G	T	T	A	T	<i>ivanovii-inlD</i>
T	T	A	A	C	A	T	T	T	G	T	T	A	A	<i>ivanovii-inlE</i>
T	T	A	A	C	T	T	T	T	G	T	T	A	T	<i>ivanovii-inlF</i>

**Abb. 2:** Palindromsequenzen aus den Promotorbereichen der PrfA regulierten Gene in (*L. monocytogenes* und *L. ivanovii*), ■ konservierte Bereiche.

Freitag und Kollegen (Freitag et al., 1992) konnten das PrfA-Regulationssystem von *L. monocytogenes* in *Bacillus subtilis* etablieren. Zu diesem Zweck wurde das *prfA*-Gen und das PrfA-abhängige Hämolysegen (*hly*) kloniert und eine PrfA abhängige Transkription des *hly*-Genes wurde induziert. Durch Einführen von Punktmutationen in die Palindromsequenz vor dem *hly*-Gen wurde die aktivierende Wirkung von PrfA auf die Transkription des *hly*-Genes vollständig unterbunden.

Die PrfA-Transkription ist Temperatur- (Leimeister et al., 1990; Mengaud et al., 1991b; Leimeister et al., 1992) und wahrscheinlich Dissaccharid-abhängig (Park et Kroll, 1993). Das *prfA*-Gen wird bei 37°C und vermutlich in „Abwesenheit von Dissacchariden“ transkribiert und aktiviert sich selbst und die weiteren Virulenzfaktoren (Park et Kroll, 1993).

Neben den Genen dieses Clusters reguliert PrfA noch weitere Gene, wie z.B. *inlA*, *inlB* und *irpA* (*inlC*). Die Internaline gehören in die Gruppe der Leucin-reichen Repeat (LRR) Proteine, die an spezifischen Protein-Protein Interaktionen beteiligt sind. Für die Internaline A und B (*InlA*, *InlB*) konnte bereits gezeigt werden, dass diese Membran-assoziierten Proteine für die Aufnahme der Listerien in normalerweise nicht-phagocytische Wirtszellen notwendig sind (Gaillard et al., 1991).

Die Gene für *InlA* und *InlB* sind in einem Operon physikalisch verbunden (Gaillard et al., 1991; Portnoy et al., 1992), das jedoch nur teilweise von PrfA reguliert wird (Lingnau et al., 1995). Dagegen ist die Expression des neu gefundenen *irpA* (*inlC*)-Gens PrfA reguliert und findet, im Gegensatz zu *inlA,B* bevorzugt im Cytosol von phagocytischen Wirtszellen statt

(Engelbrecht et al., 1996). Das IrpA (InlC) Protein wird anders als die membranständigen und wesentlich größeren InlA und InlB Proteine von *L. monocytogenes* sekretiert.

Neben den PrfA-regulierten Virulenzgenen konnten aus *L. monocytogenes* weitere PrfA-unabhängige Gene charakterisiert werden, deren Produkte ebenfalls an der Virulenz dieser Bakterien beteiligt sind. Von diesen Genen kodiert *iap* für ein sekretiertes Protein (p60), das sowohl Mureinhydrolase-Aktivität besitzt, als auch für die Adhärenz und die Invasion in nicht-phagozytische Wirtszellen, insbesondere Fibroblasten, notwendig ist (Kuhn et Goebel, 1989).

Die Gene *sod* und *kat* kodieren für die Superoxid-Dismutase und Katalase, die am Überleben der Listerien in aktivierten Makrophagen und anderen Wirtszellen beteiligt sind. Dabei scheint Katalase allerdings kaum eine Rolle zu spielen, da bei einigen Fällen festgestellt wurde, dass Katalase-negative *L. monocytogenes* eine Sepsis und Meningitis bei Listeriose-erkrankten Menschen verursachten (Bubert et al., 1997; Elsner et al., 1996).

Neueste Untersuchungen zeigen, dass PrfA-regulierte Gene sowohl *in vitro* als auch in den infizierten Wirtszellen differentiell exprimiert werden. Auch in verschiedenen Stämmen von *L. monocytogenes* konnten Unterschiede in bezug auf die Expression dieser Gene nachgewiesen werden (Sokolovic et al. 1996). Außerdem scheinen neben der Konzentration an PrfA weitere listerielle Faktoren eine Rolle zu spielen. Einer dieser Faktoren, der die Bindung von PrfA an Promotoren verschiedener PrfA-abhängiger Gene des oben beschriebenen Virulenzgen-Clusters aktiviert, konnte kürzlich teilweise charakterisiert werden und wurde als Paf (PrfA-activating factor) bezeichnet (Dickneite et al., 1998)

#### **2.1.4 Das intrazelluläre Leben von *L. monocytogenes***

Das Virulenzgencluster (*vgc*) mit den Genen *prfA*, *plcA*, *hly*, *mpl*, *actA* und *plcB* kommt in *L. monocytogenes* vor. Die gleichen Gene in der gleichen physikalischen Organisation sind auch im tierpathogenen *L. ivanovii* zu finden. Die Gene/Genprodukte weisen aber signifikante Homologieunterschiede auf. Das *vgc* ist auch im apathogenen *L. seeligeri* zu finden, dort sind die Virulenzgene allerdings durch inserierte Sequenzen, die auch Proteine kodieren, unterbrochen und sogar teilweise dupliziert (Chakraborty et al., 2000).

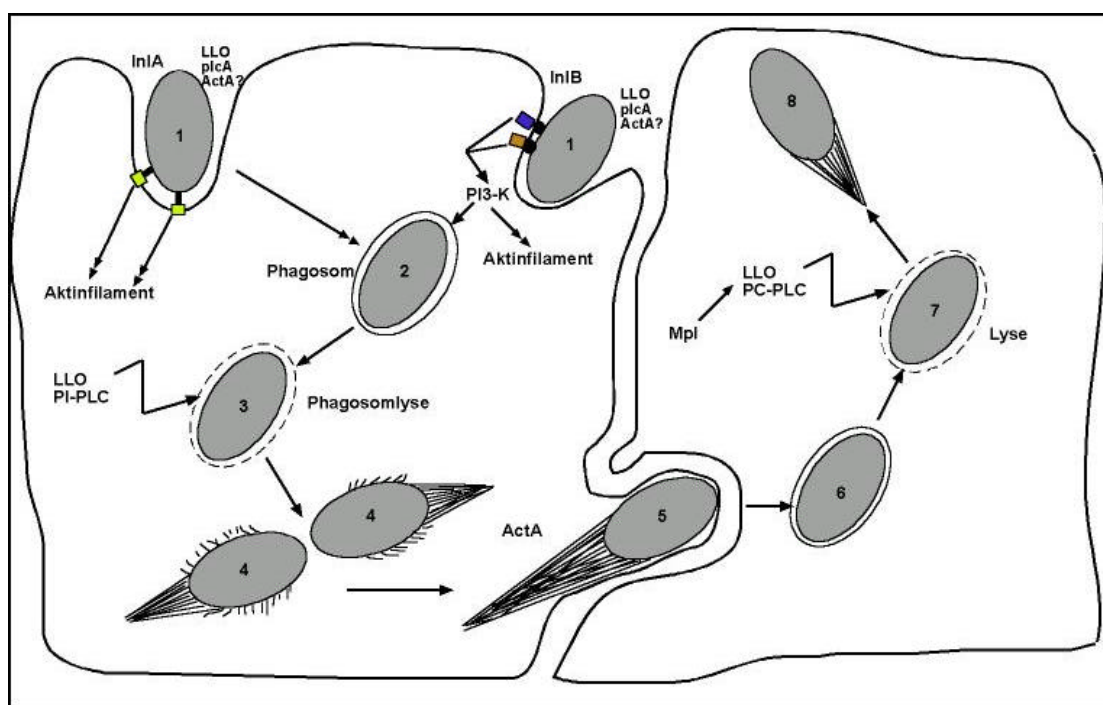
Flankiert wird *vgc* von den Genen *ldh* (Lactat-Dehydrogenase) und *prs* (Phosphoribosylsynthetase). Die Haushaltsgene *prs* und *ldh* kommen in allen Listerien vor (Chakraborty et al., 2000). Listerien können sowohl in professionellen Phagocyten (z.B. Makrophagen, Monozyten) als auch in nicht professionellen Phagozyten (z.B. Epithel-, Endothelzellen usw.) eindringen.

Nachdem die Bakterien in die ersten Zielzellen der Darmgewebes (M-Zellen) eingedrungen sind (Darm-loop-System), induzieren sie ihre Endocytose sowohl in nicht professionellen

Phagocyten (Parenchym-, Epithel- und Endothel-Zellen) als auch in Makrophagen (Farber et Peterkin, 1991; Gellin et Broome, 1989). Dies ermöglicht ihnen eine im Wirtsorganismus schnelle Ausbreitung über die Blut- und Lymphgefäße.

Der erste Schritt bei der Infektion besteht in der Anheftung an die Zielzellen. Wichtiger bakterieller Faktoren bei diesem Schritt sind die Internaline A (*inlA*) und B (*inlB*) (Gaillard et al., 1991; 1996; Dramsi et al., 1995). Die Gene *inlA* und *inlB* liegen gemeinsam in einem Operon, das nicht mit dem Virulenz-Gencluster assoziiert ist (Gaillard et al., 1991; Portnoy et al., 1992) und werden *prfA*-abhängig und -unabhängig reguliert. Internalin A und B übernehmen Funktionen bei der Adhäsion an Wirtszellen bzw. bei deren Invasion. Der zweite Schritt umfasst die aktive, durch die Listerien induzierte Aufnahme mittels Endocytose.

**Abb. 3:** Schematische Darstellung der einzelnen Phasen während der Infektion eukaryotischer Zellen durch *L. monocytogenes*. (1) Invasion/Aufnahme, (2) Bakterium in der Vakuole, (3) Lyse der Vakuole (Phagolysosom), (4) Frei im Zytoplasma, Aktinakkumulation, Vermehrung und intrazelluläre Ausbreitung, (5) Pseudopodienbildung und interzelluläre Ausbreitung, (6) Bakterien in Vakuole mit Doppelmembran, (7) Lyse der Doppelmembranen, (8) Bakterium frei im Cytoplasma. InlA-Rezeptor: **E-Cadherin** (Mengaud et al., 1996); InlB-Rezeptor: **Met-RTK** (Shen et al., 2000); **Clq-R** (Braun et al., 2000)



Internalin A interagiert spezifisch mit dem E-Cadherin von Caco-2-Zellen (Colon-Epithelzelllinie, E-Cadherin vermittelt eine  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Zell-Zell-Adhäsion durch einen homophilen Mechanismus). Vor kurzem wurde gezeigt, dass InlA nur mit Human- bzw. Meerschweinchen-E-Cadherin interagieren kann, während die Interaktion mit dem murinen E-Cadherin nicht stattfindet (Lecuit et al., 2001). Das Mausmodell ist also nicht geeignet, um die Funktion des Internalin A *in vivo* zu untersuchen. InlB vermittelt Kontakt zu

verschiedenen Zelltypen, insbesondere auch Endothelzellen und als Rezeptor wurde met-RTK identifiziert. Die Anheftung der Bakterien an die Wirtszelloberfläche über InlA und/oder InlB induziert die Internalisierung der Listerien über einen sogenannten Zipper-Mechanismus. Der Kontakt zwischen InlB und seinem Zellrezeptor führt (wahrscheinlich analog zur Interaktion von Inv mit  $\beta$ -Integrinen bei *Yersinien*) zur Aktivierung von Phosphatidylinositidkinase (PI3-K) und den kleinen GTPasen Rac und Rho mit nachfolgender Phagocytose.

Zur Abtötung phagozytierter Listerien stehen den Zellen nicht nur die in den Phagosomen gespeicherten Enzyme, sondern auch Wasserstoffperoxyd ( $H_2O_2$ ) und andere oxidierende Sauerstoffradikale ( $O_2^-$ ) zur Verfügung. Den toxischen Sauerstoffmolekülen des Phagolysosoms widersteht *L. monocytogenes* mit Enzymen wie Superoxiddismutase und Katalase. Anschließend wird diese Vakuole durch das Zusammenwirken der beiden Proteine Hly (Hämolyisin) und PlcA (Phosphatidylinositol-spezifische Phospholipase C) (Leimeister-Wächter et al., 1991; Camilli et al., 1993) lysiert. Hly (LLO) ist ein 58 kDa Protein, welches zu der Gruppe der SH-aktivierbaren porenbildenden Toxine gehört (Geoffroy et al., 1987). Dieses Toxin stellt den wichtigsten Virulenzfaktor des Bakteriums dar. Mutanten, die kein LLO mehr exprimieren, sind im Wirt nur kurze Zeit überlebensfähig und avirulent. Neben der porenbildenden Fähigkeit besitzt Listeriolysin zusätzliche Funktionen, z. B. Induktion von Zytokinen (Xiong et al., 1994; Darji et al., 1995), Leukotrienen (Scheffer et al., 1988; Sibelius et al., 1999), MAP-Kinasen (Tang et al., 1996) oder Apoptose (Guzman et al., 1996) in bestimmten Zielzellen. Das Verständnis der Wirkungsweise von Listeriolysin wird daher einen entscheidenden Beitrag zum Verständnis der Pathogenität von *L. monocytogenes* leisten.

Bisherige Daten zeigen, dass, nachdem LLO Poren in der Wirtszelle gebildet hat, mit Hilfe der PI-PlcA (phosphatidylinositolspezifische Phospholipase C) der Phosphoinositol-Phosphat (PIP)-Metabolismus und die Bildung von Inositol-Triphosphat ( $IP_3$ ) bzw. Diacylglycerol (DAG) induziert werden. Als „second messenger“ aktiviert DAG die membranständige Proteinkinase C, welche  $Ca^{2+}$ -abhängig ist. Die Freisetzung von  $Ca^{2+}$  aus dem Calcium-Speicherkompartimenten wird durch das  $IP_3$  gewährleistet, was letztendlich zur Depolymerisierung der Aktinfilamente führt. Bei Maus-Makrophagen J774 wurde auch festgestellt, dass PlcB neben LLO und PlcA eine wichtige Funktion in der Regulation des Calciumionen-Haushalts bzw. in der Kinetik der Internalisation von *L. monocytogenes* und ihre Befreiung aus der Phagosom, spielt (Wadsworth et Goldfine, 1999).

Die Funktion der beiden Phospholipasen in der intrazellulären Signaltransduktion wurde inzwischen an J774 Maus-Makrophagen getestet. Es wurde festgestellt, dass die beiden Phospholipasen (PlcA und PlcB) neben LLO eine wichtige Funktion in der Regulation des Calciumionen-Haushalts in den Makrophagen spielen.  $[Ca^{2+}]$ -Signaltransduktionswege scheinen daher sehr wichtig zu sein. Eine andere Eigenschaft von PI-PLC und PC-PLC liegt



darin, dass sie in der Lage sind, Ceramide in Endothelzellen zu induzieren, („second messengers“ für die Steuerung der Wirtszell-Signaltransduktion), NF-kappa B zu aktivieren bzw. die E-selectin-Expression und PMN-(polymorphonuclear leukocyte)-„rolling“/Adhäsion (Schwarzer et al., 1998) zu erhöhen und IL-12 in Knochenmarkmakrophagen zu induzieren (Rudnicka et al., 1997).

Anschließend werden die Listerien freigesetzt und vermehren sich nun im Cytoplasma (Kayser, 1993).

Aufgrund eines Mechanismus, bei dem G-Aktin der Wirtszelle polymerisiert wird und zu einer schweifähnlichen Struktur an einem Pol der Bakterien umgelagert wird, wandern die Listerien an die Peripherie der infizierten Zelle und induzieren die Ausbildung von länglichen Ausstülpungen der Membran. Für die intra- und interzelluläre Ausbreitung spielt ActA, ein zellwandständiges Protein, eine wichtige Rolle, da es für die Akkumulation der Aktinfilamente auf der Bakterienoberfläche verantwortlich ist. Es handelt sich hierbei um den einzigen bakteriellen Faktor, der für die Aktinakkumulation notwendig ist (Kocks et al., 1992; Domann et al., 1992). Verschiedene Zytoskelettproteine sind inzwischen in der Aktinstruktur des Schwanzes nachgewiesen worden, wie Villin, Fimbrin, Ezrin, Profilin und das eukaryotische Protein Actinin, das die Aktinfilamente kreuzvernetzt und stabilisiert. Der als VASP (Vasodilator-Stimulated Phosphoprotein) beschriebene Faktor ist der erste eukaryotische Faktor dessen direkte Bindung an ActA gezeigt werden konnte (Chakraborty et al., 1995). Die interne Prolin-reiche Region des ActA-Proteins ist wegen der Ähnlichkeit mit dem des Aktin-assoziierten eukaryotischen Protein Vinculin an diesem Prozess der bakteriellen Aktinanlagerung beteiligt (Domann et al., 1992; Niebuhr et al., 1997). Neben dem Phosphoprotein VASP interagiert ActA auch mit dem Arp2/3-Komplex (Welch et al., 1997). VASP bindet an den zentralen prolinreichen Bereich von ActA und beschleunigt durch die Rekrutierung von Profilin den Prozess der Aktinpolymerisation. Der Arp2/3-Komplex interagiert mit dem N-terminalen Bereich von ActA und initiiert die eigentliche Aktin-Polymerisation. Der Arp2/3 Komplex stellt einen essentiellen Wirtszellfaktor für die aktinbasierende Bewegung von *Listeria monocytogenes* dar (Welch et al., 1997). Der Arp2/3 Komplex interagiert auch mit Mitgliedern der Wiskott-Aldrich Syndrom Proteinen (WASP): den Scar-Proteinen und dem WASP selbst (Machesky et Insall, 1998). Weitere eukaryotische mit ActA interagierende Proteine (AIPs) wurden Mittels des "Yeast Two-Hybrid"-Tests (Maus) identifiziert, es handelt sich um drei verschiedene AIPs, von denen eines identisch mit dem humanen Protein LaXp180 (auch "CC1" genannt) ist. LaXp180 ist ein 180 kDa Protein mit über 50 theoretischen Phosphorylierungsstellen in der N-terminalen Hälfte, während die C-terminale Hälfte "coiled-coil"-Strukturen ausbilden kann. Darüber hinaus enthält LaXp180 eine Kern-Lokalisations-Sequenz und ein Leucin-Zipper-Motiv (Pfeuffer et al., 2000). Die Aktinfilamente werden akkumuliert, indem der eukaryotische Faktor VASP die Verbindung

der vier Prolin-reichen Repeats des ActA-Proteines mit dem eukaryotischen Zytoskelettprotein Profilin vermittelt (Niebuhr et al., 1997). Die Bakterien werden zusammen mit den Ausstülpungen durch benachbarte Zellen aufgenommen, es bildet sich ein neues Endosom, das nun durch zwei Membranen gebildet wird. Zur neuerlichen Freisetzung der Listerien ist nun die Lyse der Doppelmembran notwendig, bei der wiederum das Listeriolysin (Hly) sowie maßgeblich eine Phosphatidylcholin-spezifische Phospholipase C (PC-PLC oder PlcB) wirksam werden (Vazquez-Boland et al., 1992).

Mutanten in diesem Genlocus zeigen Defekte in der interzellulären Ausbreitung und sind im Mausinfektionsmodell avirulent (Raveneau et al., 1992). Deletiert man aber die beiden Gene *actA-plcB*, konnten die Bakterien weder Aktin akkumulieren noch sich von Zelle zu Zelle ausbreiten (Niebuhr et al., 1997).

### **2.1.5 Immunantworten des Wirtes auf eine Listerieninfektion**

Intrazelluläre Bakterien stellen eine Gruppe von Krankheitserregern dar, die durch die Fähigkeit ausgezeichnet sind, innerhalb von Wirtszellen zu überleben. Hierzu gehören die Erreger der Tuberkulose und Lepra, *Mycobacterium tuberculosis* und *Mycobacterium leprae*, die Erreger des Typhus, *Salmonella typhi*/*S. paratyphi*, sowie die Erreger der Listeriose und Legionärskrankheit, *Listeria monocytogenes* und *Legionella pneumophila*. Schutz gegen diese Krankheitserreger wird durch T-Lymphozyten vermittelt.

Das Gram-positive, fakultativ intrazelluläre Bakterium *L. monocytogenes* wurde schon vor Jahrzehnten eingesetzt, um die T-Zell vermittelte Immunität zu analysieren. Wird *L. monocytogenes* intravenös in Mäuse injiziert, gelangen bereits innerhalb der ersten 10 Minuten ca. 90% der Erreger über das Blut in die Leber. Sie werden dort von den Phagozyten der Leber, den Kupfferschen Sternzellen, aufgenommen und während der folgenden Stunden zerstört (Mackaness, 1962). Eine kleine Anzahl an Bakterien überlebt dennoch, adaptiert sich an das Wirtsmilieu und vermehrt sich während der folgenden 3-4 Tage innerhalb der Wirtszellen (Conlan et North, 1994).

Die Immunantwort auf eine Listerien-Infektion verläuft in zwei Phasen (Faber, 1991). Die erste Phase wird als T-Zell unabhängige Immunität bezeichnet und ist nach 24 Stunden durch die Rekrutierung von natürlichen Killerzellen (NK) zum Infektionsort gekennzeichnet, wo sie INF- $\gamma$  (Interferon-Gamma) produzieren. Die Induktion von INF- $\gamma$  verläuft mit Hilfe eines Makrophagen-abhängigen Prozesses und nicht durch direkte Wechselwirkung zwischen Bakterium und NK-Zellen. Weitere Faktoren wie TNF- $\alpha$  (Tumornekrosefaktor-  $\alpha$ ) und verschiedene Interleukine (IL-2) sind auch in der frühen antilisteriellen Abwehr von Bedeutung (Dunn et North, 1991; Metcalf et Campbell, 1994; Bancroft et Kelly, 1994). Die Aktivierung von Makrophagen durch die Interleukin-INF- $\gamma$ -Achse führt zur Produktion eines

speziellen Enzyms, das als NO-Synthase bezeichnet ist, welche die Bildung von NO (Stickoxid) aus der Aminosäure Arginin veranlasst. NO ist hochreaktiv und kann auch mit Enzymen des Atemzyklus und der Zellzyklus-Maschinerie reagieren und so das Wachstum intrazellulärer Erreger einschränken. Ob auch in aktivierten Makrophagen des Menschen ein solches Enzym exprimiert ist, ist bis heute umstritten (Jungi et al., 1999). Weitere Faktoren wie  $\gamma\beta$ -T-Zellen und  $\gamma\delta$ -T-Zellen (Vorläuferzellen im Reifungsprozess zu CD4- und CD8-Zellen), sind von großer Bedeutung in der frühen Phase der Infektionsabwehr gegen die freien Listerien und die von ihnen befallenen Zellen (Mombaerts et al., 1993). Die zweite Phase wird als T-Zell abhängige Immunität bezeichnet und setzt erst am dritten Tag der Infektion ein. Antigene (Listeriolysin, p60 oder andere) der intrazellulären Listerien werden in einem MHC (major histocompatibility complex) Klasse I-Komplex präsentiert (Brunt et al., 1990), was zu einer Stimulation der CD8<sup>+</sup>-T-Zell-Antwort und zur Zerstörung der veränderten Zielzellen führt. Listerielle Antigene können auch in einem MHC-II-Komplex als Epitope durch Makrophagen oder dendritische Zellen auf der Oberfläche präsentiert werden (Guzman et al., 1995). Eine T-Helferzelle erkennt spezifisch das Epitop auf dem MHC-II-Molekül. Dieser Erkennungsvorgang aktiviert die Antigen-präsentierende Zelle (APZ) (z.B. Makrophagen), die daraufhin Interleukine produzieren. Diese regen ihrerseits die CD4<sup>+</sup>-T-Zellen zur Proliferation an (IL-1) und fördern die Sekretion weiterer Botenstoffe (IL-2,  $\gamma$ -IFN usw.). Eine B-Zelle, die mit ihrem Oberflächen-Ig das andere Epitop auf dem intakten Antigen erkannt und aufgenommen hat, präsentiert genau wie die APZ ebenfalls das Epitop (das selbe Epitop, das von APZ präsentiert wird) auf ihrem MHC-II. Dadurch kommt eine direkte Interaktion zwischen CD4<sup>+</sup>-T-Zellen und spezifischen B-Zellen zustande, die wiederum zu Proliferation, Differenzierung und Umschalten der B-Zelle von IgM zu anderen Ig-Klassen führt. Den CD8<sup>+</sup>-T-Zell-Vorläufern kommt dabei i.d.R. keine kontaktvermittelte CD4<sup>+</sup>-T-Zell-Hilfe zuteil, sondern sie werden über Botenstoffe wie IL-2 oder  $\gamma$ -IFN unterstützt.

Die Transkription von MHC-I- und MHC-II-Genen wird mit unterschiedlicher Kinetik nach der Infektion von Makrophagen mit *L. monocytogenes* unterdrückt. Mit Hilfe einer auf einer PCR basierenden Methode zur Darstellung differentiell exprimierter Säugergene wurden Gene identifiziert, die nach einer *L. monocytogenes*-Infektion von Makrophagen unterschiedlich transkribiert werden. Von den auf diese Weise identifizierten Genen, deren Expression verändert ist, kodiert eines für eine Protein-Tyrosin-spezifische Phosphatase (MKP-1), die am Abschalten von eukaryotischen Signaltransduktionswegen beteiligt ist.

Eine Listerien-Infektion von HeLa-Zellen induziert die Phosphorylierung der Raf-MEK-MAP Kinase Kaskade. Diese durch *L. monocytogenes* induzierte Aktivierung einer wichtigen eukaryotischen Signaltransduktionskaskade verläuft transient und wird durch das porenbildende Listeriolysin O ausgelöst. Diese Kaskade scheint daher an der

Signalübertragung bei einer Listerien-Infektion beteiligt zu sein. Die vorher beschriebene Induktion von MKP-1 durch eine *L. monocytogenes*-Infektion könnte damit für eine Unterbrechung der oben erwähnten Signalübertragungskaskade sorgen (Schwan, 1996; Weiglein et al., 1997).

Von mehreren untersuchten Transkriptionsfaktoren konnte nur die Aktivierung von NF- $\kappa$ B durch eine Listerien-Infektion nachgewiesen werden. Der Effekt einer *L. monocytogenes* Infektion auf den zellulären Level des wichtigen Transkriptionsfaktors NF-kappaB wurde in der humanen Epithelzelllinie Caco-2 und in der murinen Makrophagen-ähnlichen Zelllinie P388D1 untersucht. Die Infektion mit *L. monocytogenes* oder die Behandlung der Zellen mit listerieller Lipoteichonsäure induziert die Bildung unterschiedlicher NF-kappaB-ähnlicher DNA-Protein Komplexe in beiden Zelltypen (Hauf et al., 1997 und 1999). Die NF-kappaB Aktivierung in mit *L. monocytogenes* infizierten P388D1 Makrophagen zeigt eine biphasische Kinetik: Eine schnelle und transiente erste Phase, die auch durch die Behandlung mit Lipoteichonsäure ausgelöst werden kann und eine zweite, langanhaltende Phase, die der Expression der listeriellen Phospholipasen PI-PLC und PC-PLC bedarf. Der NF-kappaB Aktivierung in P388D1 Macrophagen geht eine Degradation der inhibitorischen Proteine I-kappaB-alpha (transiente Phase) und I-kappaB-beta (persistente Phase) voraus (Hauf, 1997). Die NF-kappaB Aktivierung in mit *L. monocytogenes* infizierten Caco-2 Zellen unterscheidet sich von der NF-kappaB Aktivierung in infizierten P388D1 Macrophagen bezüglich der Art der induzierten NF-kappaB Komplexe wie auch der Kinetik der Bildung der Komplexe (Hauf et al., 1999).

## **2.2 Bekannte Adhäsions- und Invasions-Mechanismen bei Bakterien**

### **2.2.1 Adhäsine**

Pathogene Bakterien adhärieren über verschiedene Oberflächenstrukturen (Haftpili, Haftfimbrien, Haftproteine der äußeren Membran der gramnegativen Bakterien; Zellwand-assoziierte Proteine der grampositiven Bakterien) an Rezeptoren auf der Oberfläche der Zielzellen. Die Adhärenz ist vor allem wichtig beim Kontakt mit Oberflächengewebe, die von Flüssigkeiten umspült werden (z.B. der Mukosa). Für intrazelluläre Bakterien ist die Adhärenz eine Voraussetzung für ihre Invasion, für nicht invasive Bakterien der erste Schritt zur Freisetzung von bakteriellen Toxinen. Dieser Prozess ist spezifisch, d.h. die Haftstruktur und der Rezeptor müssen ähnlich zusammenpassen wie ein Schlüssel zum Schließzylinder (Domann, 1998).

Adhäsine	Typische Beispiele
Lektine	Glykanbindungs-Lektine von <i>Streptococcus sobrinus</i>
Fimbrien (Pili)	Filamentöse P-, S-, Typ1, K88, K99 und CFA1-Fimbrien (Pili) pathogener <i>E. coli</i> ; Typ4-Fimbrien (Pili) von <i>Neisseria gonorrhoeae</i>
Nicht-Fimbrien Adhäsine	Tcp-Fimbrien (Pili) von <i>Vibrio cholerae</i> Pertactin von <i>Bordetella pertussis</i> ; Fibronektin-Bindungsprotein von <i>Treponema Pallidum</i>
Lipide	Lipoteichonsäuren von <i>Streptococcus pyogenes</i>
Glykosaminyglykane von <i>Chlamydia trachomatis</i>	Heparansulfat-ähnliches Glykosaminyglykan

**Tab. 2:** Adhäsine (nach Domann, 1998)

Bakterien können passiv über Mikro- oder Makrotraumen der Haut und der Schleimhäute in den Wirt eindringen. Oft sind die über eine intakte Mukosa eindringenden Bakterien in der Lage, nach ihrer Adhärenz aktiv diese anatomische Barriere zu überwinden. Hier sind je nach Bakterienart unterschiedliche Prozesse verantwortlich.

Unter den Bakterien gibt es Vertreter, die über Pathogenitätsfaktoren verfügen, die ihnen die Überwindung von Schutzbarrieren des Körpers ermöglichen und die professionelle Phagozyten (Makrophagen, Monozyten) und nicht-professionelle Phagozyten (Epithel-, Endothelzellen) invadieren und dort überleben können. Unter diesen Vertretern wird zwischen obligat und fakultativ intrazellulären Bakterien unterschieden (Domann, 1998).

Obligat intrazelluläre Bakterien	Fakultativ intrazelluläre Bakterien
<i>Chlamydia</i> spp., <i>Coxiella burnetii</i> ,	<i>Brucella</i> spp., <i>Legionella</i> spp., <i>Listeria</i> spp.,
<i>Ehrlichia</i> spp., <i>Erwinia</i> spp., <i>Rickettsia</i> spp.	<i>Mycobacterium</i> spp., <i>Neisseria</i> spp., <i>Salmonella</i> spp., <i>Shigella</i> spp., <i>Yersinia</i> spp.

**Tab. 3:** Intrazelluläre Bakterien (nach Domann, 1998)

Obligat intrazelluläre Bakterien sind nicht in der Lage, sich außerhalb von Wirtszellen zu vermehren. Diese Abhängigkeit von Wirtszellen beruht unter anderem darauf, dass diese Bakterien nicht mehr imstande sind, bestimmte essentielle Moleküle selbst zu synthetisieren („Stoffwechselparasitismus“). Im Gegensatz dazu sind die professionell-fakultativ

intrazellulären Bakterien zum Wachstum sowohl außerhalb als auch innerhalb von Wirtszellen fähig.

### 2.2.2 Invasine

Über die Invasionsfaktoren und -mechanismen von Bakterien wurden in den vergangenen Jahren intensive molekulare Studien durchgeführt.

Adhäsion an Wirtszellen oder extrazelluläre Matrix stellt einen wichtigen ersten Schritt bei der Etablierung einer Infektion durch Pathogene dar. Allerdings sind adhärierende Bakterien dem Angriff des Immunsystems des Wirtes, der Wirkung von Antibiotika und natürlich mechanischen Abwehrmechanismen wie Cilienschlag in den Bronchien, der Ausspülung in den Harnwegen oder der Peristaltik des Darmes ausgesetzt. Für Pathogene kann es daher von Vorteil sein, sich in Wirtszellen einzunisten. Die intrazelluläre Lokalisierung bietet nicht nur Schutz, sondern kann auch der Beginn der Ausbreitung in tieferes Wirtsgewebe oder sogar zur systemischen Dissemination sein. Tatsächlich ist diese Fähigkeit zum Eindringen und Überleben in phagocytische und/oder nichtphagocytische Wirtszellen schon länger für die obligat intrazellulären und die professionell-fakultativ intrazellulären Bakterien bekannt.

Die Analyse der Invasionsprozesse pathogener Mikroorganismen hat eine Disziplin der molekularen Infektionsbiologie in Gang gebracht, die als zelluläre Mikrobiologie bezeichnet wird. Ausgelöst vom Studium der bakteriellen Invasion befasst sich die zelluläre Mikrobiologie heute generell mit dem Einfluss mikrobieller Faktoren auf Stoffwechsel und Signaltransduktion der eukaryotischen Zelle.

#### 2.2.2.1 Trigger- und Zipper-Mechanismus

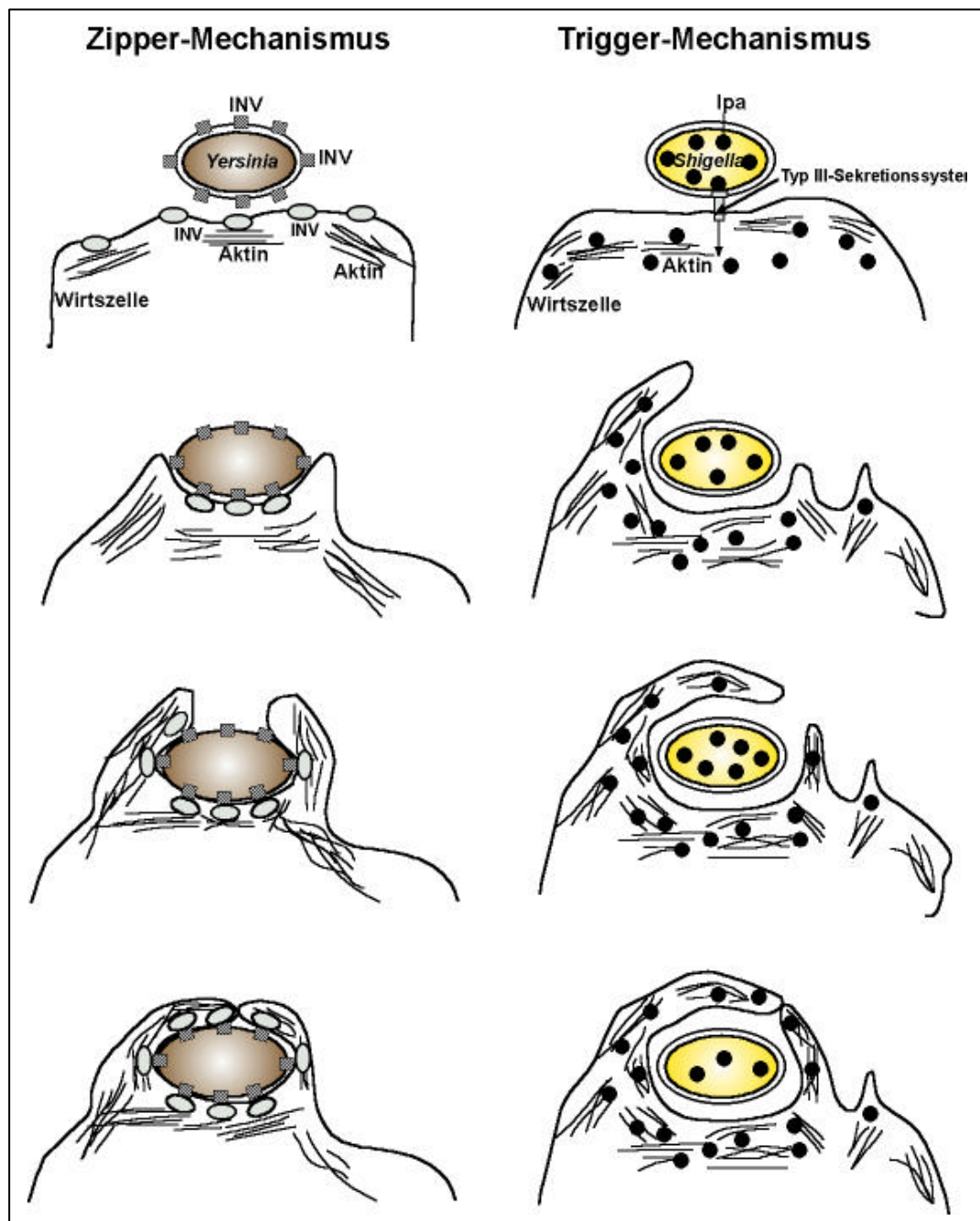
Über die Invasionsfaktoren und -mechanismen von Bakterien wurden in den vergangenen Jahren intensive molekulare Studien durchgeführt.

Der Aufnahmeprozess pathogener Mikroorganismen in eukaryotische Zellen beginnt mit der Interaktion eines bakteriellen Liganden, dem Invasionsprotein, mit seinem komplementären Rezeptor auf der Wirtszelle. Diese Wechselwirkung induziert eine Signaltransduktion in der Wirtszelle, die zu einer lokalen Umstrukturierung des Zytoskelettes führt, die dann für die folgende Aufnahme der Bakterien in die Wirtszelle notwendig ist. Es lassen sich zwei prinzipielle Internalisierungsmechanismen dabei unterscheiden: Der Auslöse-(Trigger-) und der Reißverschluss-(Zipper-) Mechanismus.

Beim Reißverschlussmechanismus werden Oberflächenmoleküle ausgenutzt, die offensichtlich bei der zellulären Adhäsion involviert sind. Zum Beispiel vermitteln Cadherine (Rezeptor für InlA von *Listeria*) und Integrine (Rezeptor für Invasin von *Yersinia*) die

Anheftung der eukaryontischen Zellen an Nachbarzellen oder die darunterliegende extrazelluläre Matrix. Durch die normalerweise vorgesehene Wechselwirkung zwischen Rezeptor und Ligand kommt es zu einer „Clusterung“. Hierdurch werden Signalkaskaden induziert, die zu einer Verstärkung der Zell-Zell und Zell-Matrix Kontakt, aber auch zu Zelldifferenzierung führen. Binden Bakterien mit ihren Ligandenmolekülen an solche Rezeptormoleküle, wird die Bakterienzelle von der Wirtszellplasmamembran umstülpt, bis das Bakterium völlig eingeschlossen und aufgenommen ist.

Beim Auslösemechanismus, repräsentiert durch die Internalisierung von *Shigella* spp., enteroinvasiven *E. coli* und *Salmonella*, muss die Bakterienzelle nicht unbedingt in engem physikalischem Kontakt mit der Wirtszelle stehen. Es werden vielmehr bakterielle Induktoren, die eine rasche, ausgedehnte Antwort des Zytoskeletts verursachen, produziert, wobei explosionsartig unter der Plasmamembran Aktinfilamente polymerisiert werden, die wiederum zur Bildung von großflächigen Ausstülpungen, sogenannten „Membrane Ruffles“, führen. Die sich ausstülpenden Membranteile verwerfen sich, fusionieren wieder mit der Wirtszelloberfläche und bilden große Taschen mit extrazellulärem Medium in der Zelle. Dieser Prozess wird auch als Makropinozytose bezeichnet. Das Bakterium, welches in der Nähe der Wirtszelloberfläche lokalisiert ist, wird in einem von einer Membran umgebenden Kompartiment aufgenommen, einschließlich intrazellulär in einer Vakuole (Parsot et Sansonetti, 1996).



**Abb. 4:** Schematische Darstellung der zwei prinzipiellen Internalisierungsmechanismen. Beispielhaft für die Internalisierung nach dem Zipper-Mechanismus ist die Aufnahme von *Yersinia* spp. und nach dem Trigger-Mechanismus ist die Aufnahme von *Shigella* spp. dargestellt.



## 2.2.2.2 Bekannte bakterielle Invasionsmechanismen

Spezies	Internalisierungs- -modus	Invasions - -protein	Internalisierungs- -rezeptor
EPEC	Trigger und Zipper	Intimin (EaeA)	Tir (Hp90)
<i>Klebsiella pneumonia</i>	Trigger und Zipper	?	GlcNAc von N-glykosyliertem Protein
<i>Listeria monocytogenes</i>	Zipper	Internalin A Internalin B	E-Cadherin met-RTK ; gC1q-R/32
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Trigger und Zipper	Fibronectin an 55-kDa-Omp	$\alpha_5\beta_1$ -Integrine
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Trigger und Zipper	Opa30 Opa52 Vitronectin an Opc	syndecanähnliches Proteoglycan CD66 $\alpha_v\beta_3$ – oder $\alpha_5\beta_1$ Integrine
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	Trigger und Zipper	Pilus	48-kDa-Proteine auf Zahnfleischpithel- zellen
<i>Salmonella typhimurium</i>	Zipper	Sip	Rezeptoren für Wachstumsfaktoren
<i>Salmonella typhi</i>	Zipper	Sip	CFTR cystic fibrosis - transmembrane conductance regulator
<i>Shigella flexnerie</i>	Zipper	IpaB-D	$\alpha_5\beta_1$ Integrin?
UPEC	Trigger	Dr-Fimbrien	SCR-3 des <i>deca</i> Accelerating factors
<i>Yersinia-Spezies</i>	Zipper	Invasin (inv) YadA	$\beta_1$ -Integrine $\beta_1$ -Integrine
<i>Bacteroides forsythus</i>	?	BspA	ECM (Extracellular Matrix)

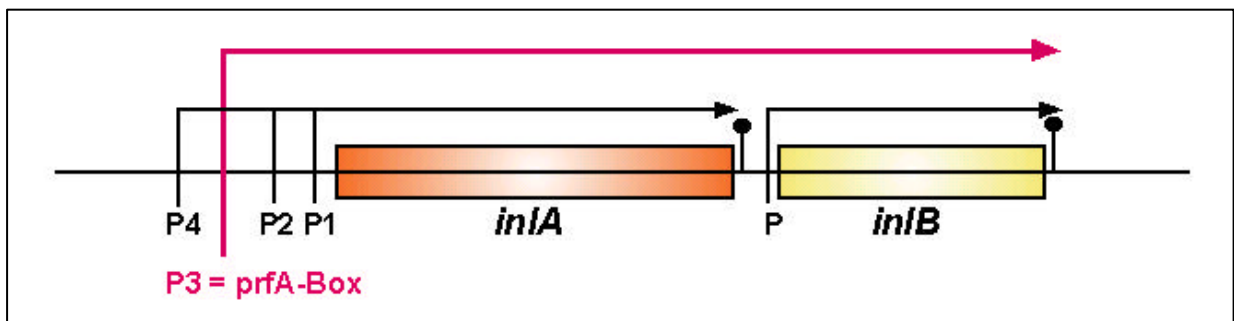
**Tab. 4:** Bekannte bakterielle Invasionsmechanismen, die korrespondierenden Internalisierungsrezeptoren und die beteiligte(n) Cytoskelettkomponente(n) (nach Hacker, J. und Heesemann, J., 2000)

### 2.3 Adhäsion bzw. Invasion des fakultativintrazellulären Bakteriums *L. monocytogenes*

Es ist bekannt, dass das grampositive, fakultativ intrazelluläre Bakterium *L. monocytogenes* durch Aufnahme kontaminierter Lebensmittel in den Menschen gelangt und besonders bei schwangeren, immungeschwächten oder älteren Patienten eine Listeriose mit hoher Mortalitätsrate erzeugen kann. Es ist in der Lage, die intestinale und die plazentale Barriere und die Blut-Hirn-Schranke zu überschreiten. Frühe elektronenmikroskopische Studien haben gezeigt, dass dieses pathogene Bakterium in der Lage ist, Epithelzellen der Hornhaut und des Darms zu invadieren (Racz et al., 1972).

Die Bakterien induzieren ihre eigene Phagocytose in nicht-professionelle Phagocyten (z.B. Epithelzellen, Endothelzellen, Fibroblasten) und werden aktiv von Makrophagen aufgenommen.

Durch das konjugative Transposon *Tn1545* konnten Mutanten des *L. monocytogenes*-Stammes EGD-e-SmR isoliert werden, die in die Dickdarmtumor-Zelllinie Caco-2 um den Faktor 100-200 schlechter eindringen als der Wildtyp (Gaillard et al., 1991). Der Insertionsort des Transposons in dieser nicht invasiven Mutante lag stromaufwärts von zwei homologen Genen, die als *inlA* (Internalin A) und *inlB* (Internalin B) bezeichnet wurden. Die Stimulation der Phagocytose von *L. monocytogenes* steht im Zusammenhang mit den Genprodukten von *inlA* und *inlB*.



**Abb. 5:** Genetische Organisation des *inlAB*-Operons. P: Promotor; T: Terminator; mRNA: mRNA

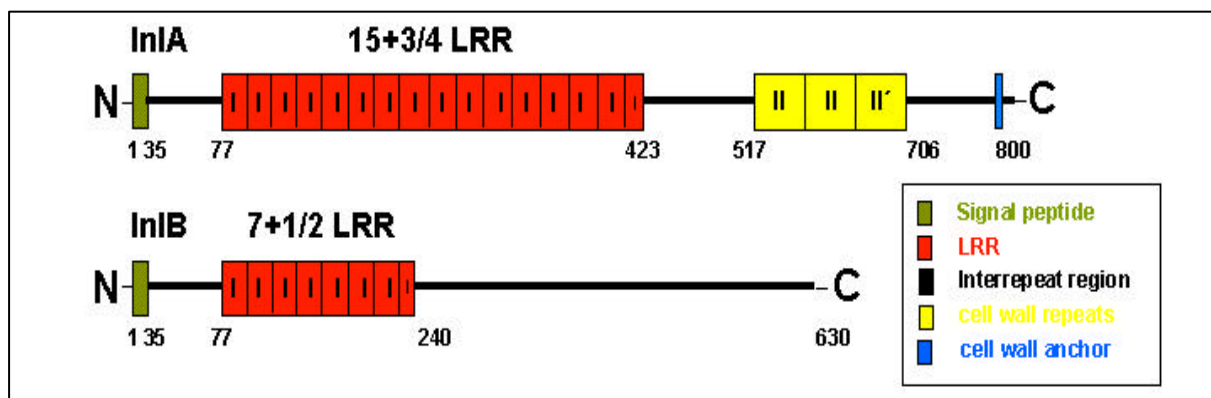
Die Gene für *inlA* (2442 bp) und *inlB* (1890 bp) sind in einem Operon organisiert. RNA-Transkriptionsstudien zeigten, dass die *inlA*- und *inlB*-Gene sowohl poly- als auch monocistronisch transkribiert werden können (Lingnau et al., 1995). Durch Kartierung der Promotoren wurden für *inlA* vier Promotoren und ein Promotor für *inlB* gefunden. Von den 5 beschriebenen *inlAB*-Promotoren scheint nur ein einziger Promotor PrfA (Positiv Regulator Protein)-abhängig zu sein (Lingnau et al., 1995). Dieser PrfA-abhängige Promotorbereich liegt 431 bp stromaufwärts von *inlA*, und enthält eine 14 bp große *PprfA*-Box. Die polycistronische Transkription von *inlAB* (4.800 Nukleotiden) ist PrfA-abhängig. Die

Transkription der Gene ist bei 37°C deutlich höher als bei 25°C und damit temperaturabhängig und sie ist während der exponentiellen Wachstumsphase am stärksten.

Das *inlA*-Gen kodiert für ein Protein von 800 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 88 kDa, welches aus zwei „repeat“-Regionen (I und II) besteht. Die erste Region I ist zwischen den As. 85 und 415 lokalisiert und besteht aus acht aufeinanderfolgenden Leucin-reichen Repeats (LRR) von jeweils 22 Aminosäuren. Die zweite Region II reicht von den As. 517 bis 707 und besteht aus 3 sich wiederholenden „repeat“-Abschnitten. Die ersten beiden Abschnitte haben eine Länge von 70 As, der dritte Abschnitt besteht aus 49 As.

InlA besitzt am N-Terminus eine Signalsequenz zum Transport des Proteins durch die Zellmembran und am C-Terminus einen Zellwandanker mit dem Motiv LPTTG, gefolgt von einer Reihe von 22 hydrophobischen Aminosäuren und endet mit einem Rest aus positiv geladenen As.

InlB besteht aus 630 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 65 kDa. Es verfügt am N-Terminus ebenfalls über ein Signalpeptid. Die folgenden 7 Repeats sind mit einer jeweiligen Länge von 22 As. und zahlreichen Leucinen homolog zu den Leucin-reichen Repeats von Internalin A und begründen die nahe Verwandtschaft dieser Moleküle. Der Rest des Moleküls besteht bis zum C-Terminus aus einer Aminosäuresequenz ohne erkennbare besondere Merkmale, die auf ihre Funktion hindeuten könnten.



**Abb. 6:** Darstellung der Internaline InlA und InlB. Die Leucin-reichen Repeats, die in allen zwei Molekülen vorhanden sind, sind als Repeats I und die zusätzlichen Repeats in Internalin A als Repeats II gekennzeichnet. Die schwarze Box am N-terminalen Ende der Moleküle repräsentiert die Signalsequenz, die blaue Box am C-terminalen Ende von InlA den putativen Membrananker.

Durch chromosomale Deletionsmutationen im *inlAB*-Genlocus konnte gezeigt werden, dass InlB für die Invasion von *Listeria monocytogenes* in humane Hepatocyten, aber nicht für die Invasion von Darmepithelzellen benötigt wird (Dramsi et al., 1995).

Eine Wirtszellspezifität der Internaline für unterschiedliche eukaryotischen Zellkulturen wurde für InlA mit Caco-2-Zellen (Gaillard et al., 1991) gezeigt, während InlB entscheidend bei der Invasion in U-373, Henle407, HeLa (Ireton et al., 1996), L-929, HUVEC (Parida et

al., 1998) und VERO ist. Allerdings wirkt InternalinB bei der Invasion in Caco-2-Zellen als Invasionsverstärker. Bei Hep-G2 (Dramsi et al., 1995), PtK2 und HT-29 sind beide Internaline in der Lage, die Invasion der Bakterien zu vermitteln (Torsten Hain, 1999). Die N-terminale-Domänen der beiden Proteine InlA und InlB bestehen aus mehreren Leucinreichen-Repeats (LRR), die eine wichtige Funktion bei der Internalisierung des Bakteriums haben (Braun et al., 1999; Cossart et Lecuit, 1998). Bis auf die hydrophoben Aminosäurereste wie Leucine, Isoleucine oder seltener auch Valine, die das sogenannte Rückgrat der LRR bilden und hoch konserviert sind, unterscheiden sich die restlichen Aminosäuren der LRR erheblich, was dazu führt, dass die beiden Internaline A und B eine unterschiedliche Spezifität für Säugerzellen vermitteln.

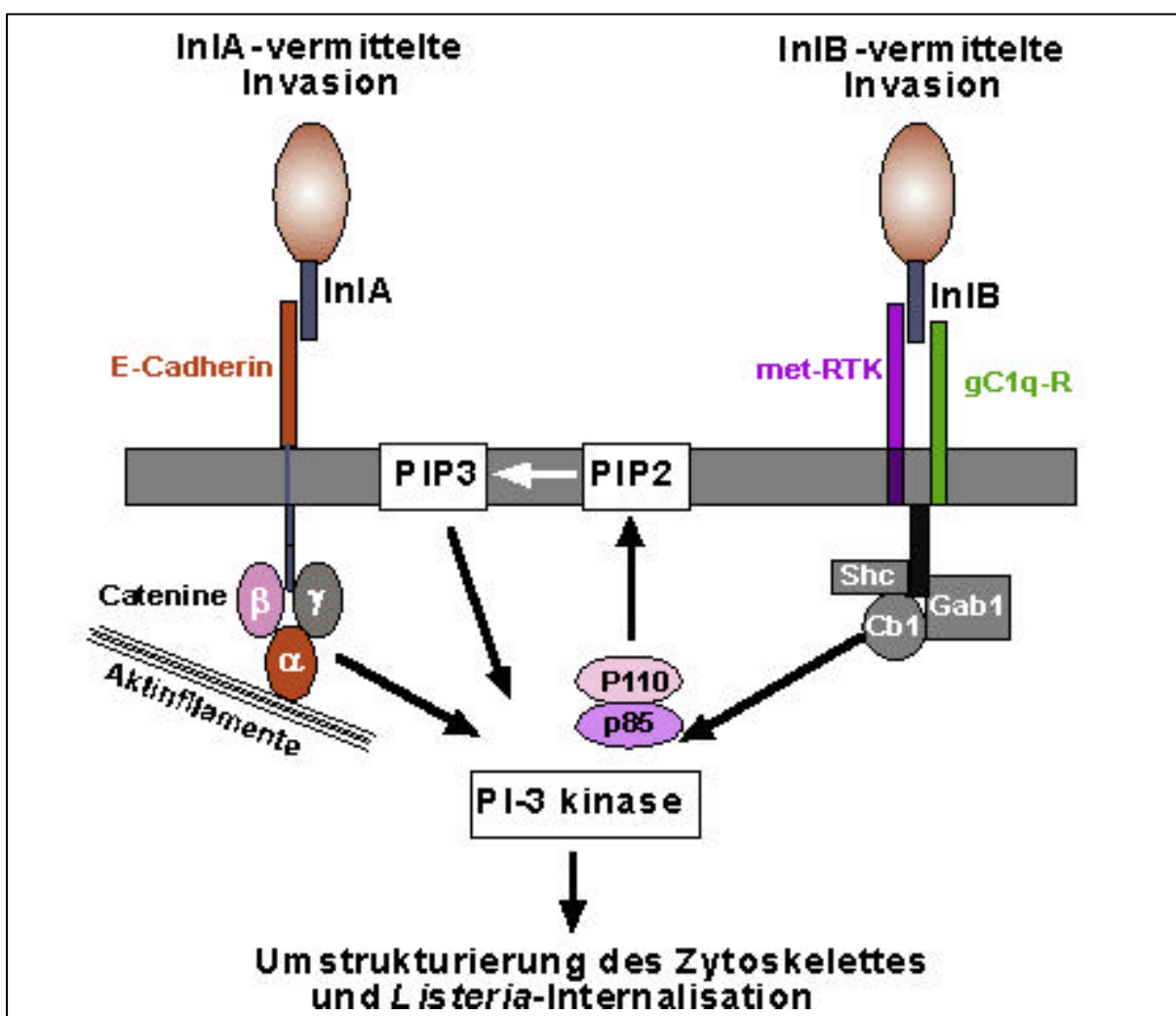


Abb. 7: Darstellung der verschiedenen Internalisationswege von *L. monocytogenes*.

Der eukaryotische Rezeptor für InlA wurde 1996 von Mengaud et al. als E-Cadherin (epitheliales Cadherin) identifiziert. E-Cadherin gehört zu einer Familie membranständiger Adhäsionsmoleküle, die an der Bildung von Geweben und Organen (Morphogenese) beteiligt

sind und daher zu den morphoregulatorischen Proteinen gezählt werden (Takeichi, 1991). Cadherine lassen sich ihrer Struktur nach in drei Bereiche unterteilen. In eine extrazelluläre Domäne, die mit einem spezifischen Bindungsmotiv die homophile Wechselwirkung zwischen Zellen vermittelt ( $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Zell-Zell-Adhäsionsmoleküle). Eine Transmembranregion und eine cytoplasmatische Domäne, die Komplexe mit drei cytoplasmatischen Proteinen, den Cateninen bildet. Von den Cadherin/Catenin-Komplexen wird vermutet, dass sie eine Verbindung zu Elementen des Zytoskelettes herstellen, so z. B. zum Actin-Microfilament-System der Wirtszelle (Abb.7). Die Wechselwirkung der zwei Moleküle führt zur Bindung und Aufnahme des pathogenen Bakteriums (Zipper-Mechanismus), wobei Differenzierungsschritte und Funktionsänderungen der angesprochenen Zelle (Signaltransduktionsreaktionen) ausgelöst werden. Wie die genauen Vorgänge der Signaltransduktionskaskade in der Wirtszelle durch Interaktion von InlA/E-Cadherin in der Internalisierung von *Listeria monocytogenes* ablaufen, ist Gegenstand derzeitiger Untersuchungen.

Im Fall von InlB wurden zum Teil einige Signaltransduktionsvorgänge charakterisiert.

1999 wurde durch die Arbeit von Ireton et al. an mit gereinigtem InlB-Protein behandelten Vero-Zellen festgestellt, dass die Wirtszell-Phosphoinositid (PI) 3-Kinase p85-p110 aktiviert wird. Die Aktivierung von PI 3-Kinase stimmt mit der Tyrosin-Phosphorylierung der Adapterproteine Gab1 und Cbl und der Entsehung des Gab1.p85 überein.

P85-p110 ist eine heterodimerische Lipid-Kinase, die eine wichtige Rolle in der Regulation des Zellwachstums, Apoptose, und/oder die Aktinzytoskelettantwort durch verschiedene Faktoren spielt (Fruman et al., 1998). Die „Met“ Receptor Tyrosin Kinase (RTK) ist ein bekannter Rezeptor, der eine Verbindung zu p85-p110 und den Adapterproteinen Gab1 und Cbl besitzt (Birchmeier et Gherhardi, 1998; Trusolino et al., 1998).

Weitere Untersuchungen haben gezeigt, dass die Behandlung von Säugerzellen mit gereinigtem InlB-Protein schnell die Tyrosinphosphorylierung von „Met“ verursacht, für das der Hepatocyten-Wachstumsfaktor (HGF) der einzige bisher bekannte Ligand ist. Wie HGF bindet InlB offensichtlich an die extrazelluläre Domäne von „Met“ und induziert "das Zerstören" der Epithelzellen ("Scatter" Faktor). Experimente mit Met-positiven und Met-defizienten Zelllinien zeigen, dass „Met“ wichtig für die InlB-abhängige Invasion von *L. monocytogenes* ist. InlB ist ein neuer Met-Ligand, der die Invasion von *Listeria monocytogenes* durch Ausnutzung des RTK-Weges verursacht (Shen et al., 2000).

Mit Affinitätschromatographie und „Enzym-linked Immunosorbent assay“, wurde eine direkte Interaktion zwischen InlB und dem zellulären Rezeptor gC1qR demonstriert. Lösliches C1q oder anti-gC1qR-Antikörper verhindern die InlB-vermittelte Invasion. Transfektion der Zellen GPC16 (nicht suszeptibel für eine InlB-vermittelte Invasion) mit einem Plasmid, das humanes gC1qR exprimiert, fördert die Invasion von mit InlB- gekoppelten Partikeln (InlB-coated

beads). Außerdem zeigten einige Experimente, dass die Membran-Rekrutierung und Aktivierung von PI 3-Kinase eine InlB-gC1qR Interaktion miteinbeziehen und dass die Stimulation von Vero-Zellen mit InlB einen gC1qR-Gab1-Komplex hervorruft. gC1qR stellt möglicherweise einen zellulären Rezeptor für InlB vor, dessen Aktivierung eine PI 3-Kinase und eine Tyrosinphosphorylierung des Adapterproteins Gab1 veranlasst (Braun et al., 2000).

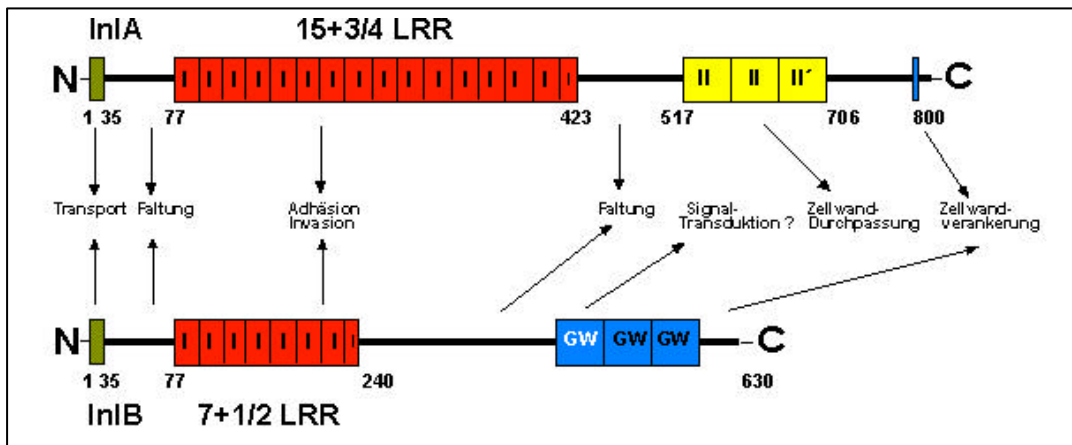
Die Adhäsion und Invasion von *L. monocytogenes* in die eukaryotischen Zellen kann auch durch die elektrostatische Interaktion des positiven geladenen N-Terminus von ActA (auch wichtige Region an der Aktinakkumulation) und dem „Heparan Sulfate Proteoglycan“ (HSPG)-Zellrezeptor vermittelt werden (Alvarez-Dominguez et al., 1997). Ähnliche positive geladene Motiven wurden auch bei der Heparin-bindenden-Domäne von HS (Heparan Sulfat)-bindenden-Proteinen beobachtet (Jackson et al., 1991; Sobel et al., 1992). An der Interaktion von *L. monocytogenes* mit der Zielzellmembran, bzw. Adhäsion und Invasion, könnte auch das PC-PLC-Enzym einen wichtigen Betrag leisten, weil es offensichtlich in der Lage ist, Glykosylphosphatidylinositol-Anker zu spalten (Goldfine et al., 1992; Mengaud et al. Knob, 1991).

Durch Deletion der LRR von InternalinA und InternalinB, sowie durch den Austausch der LRR von InternalinA und InternalinB untereinander wurde die zentrale Rolle dieser Domäne sowohl für den Invasionsprozess als auch für die Wirtszellspezifität der Listerien zum erstenmal gezeigt (Torsten Hain, 1999).

InternalinA (InlA) ist analog zu Staphylokokken und Streptokokken durch das Motiv LPTTG in der Zellwand verankert und wird nach außen präsentiert und ist daher nur in geringen Mengen im Überstand zu finden. Jedoch ist InlB ohne einen solchen Zellwandanker an seinem C-Terminus auch in der Lage, sich an die Zellwand zu heften. 1997 wurde dieser neue Mechanismus einer Zellwandassoziation durch die Arbeit von Braun beschrieben. Hierbei war die C-Terminale Region von InlB durch drei sich wiederholende Motive von Bedeutung, die eine Länge von ungefähr 80 As. besitzen und jeweils mit dem Dipeptid GW (Glycin und Tryptophan) starten, charakterisiert. Durch die Arbeit von Torsten Hain (1999) konnte gezeigt werden, dass Internalin B nicht ausschließlich durch die GW-Motive des C-Terminus auf der Oberfläche der Listerien verankert wird. Die C-terminal flankierenden 82 As. der LRR von InlB, die diese Motive nicht besitzen, sind bei der Reassoziation ausreichend.

Für die Adhäsion und Invasion der Internaline ist die korrekte Faltung der LRR durch die N-terminal (50 As.) und C-terminal (82 As.) flankierenden Aminosäuren der LRR von Bedeutung (Torsten Hain, 1999).

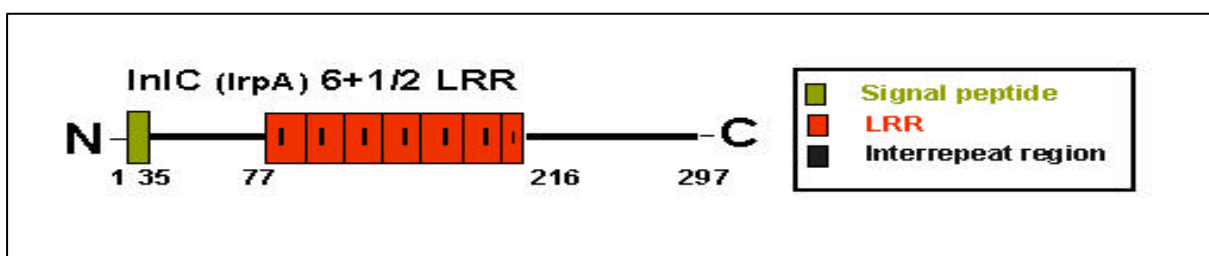
Abb. 8: Darstellung der Internalin-Funktionsbereiche (nach Torsten Hain, 1999)



## 2.4. Internalin-Familie in *L. monocytogenes* EGD

Neben den bereits beschriebenen InlA- und InlB-Proteinen wurde ein drittes Mitglied der Internaline identifiziert und charakterisiert (Lingnau, 1996; Engelbrecht, 1996; Domann et al. 1997). Es handelt sich um ein 297 Aminosäuren langes Molekül mit einem kalkulierten Molekulargewicht von 33.104 kDa. Obwohl es sich bei diesem Molekül um ein kleines Polypeptid handelt, weist es signifikante Homologien und konservierte Strukturen zu den größeren Molekülen der Internaline A und B auf. Es besitzt wie InlA und InlB ein Signalpeptid und Leucin-reiche Repeats, allerdings nur in verminderter Anzahl. Den LRR's ist ein Spacer von 50 As. vorgelagert. Aufgrund seiner Homologien zu InlA und InlB wurde das Molekül als IrpA („Internalin-related protein“) bezeichnet (Domann et al., 1997).

Abb. 9: Darstellung von InlC (IrpA).

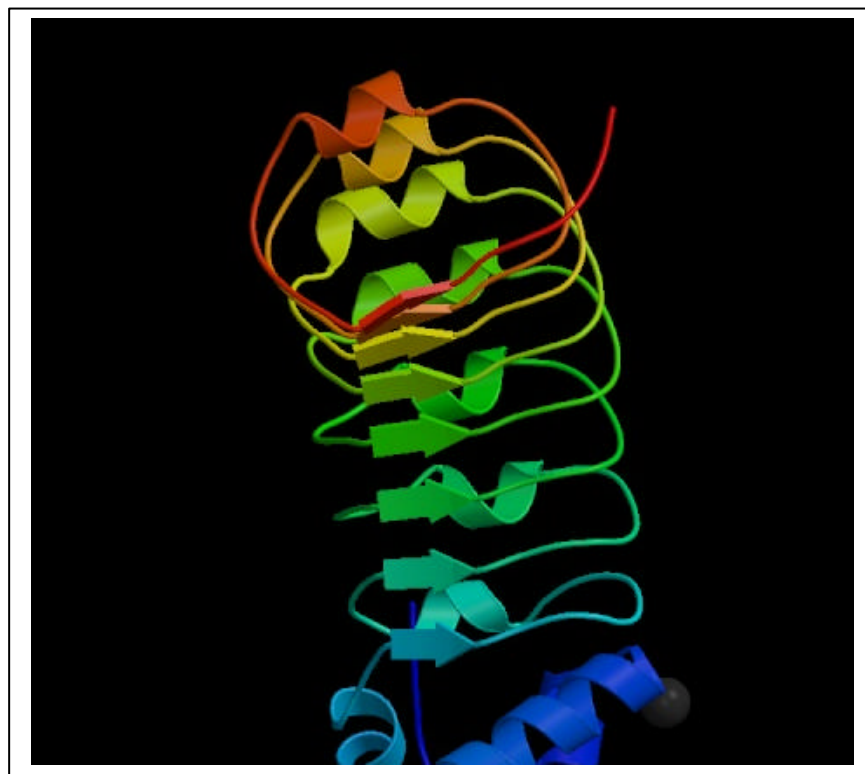


Die Funktion des nur in pathogenen Listerien vorhandenen und unter PrfA-Regulation stehenden Internalin-verwandten Proteins IrpA (Lingnau et al., 1996; Domann et al., 1997), auch als InlC bezeichnet (Engelbrecht et al., 1996), ist bis jetzt nicht bekannt.

Internalinproteine gehören zu der LRR-Superfamilie. Die Leucin-reichen Repeats (LRR) sind kurze Sequenzmotive (20 bis 29 Aminosäuren), die in über 60 verschiedenen Proteinen, meistens eukaryotischen, vorkommen. Die meisten von diesen sind in Protein-Protein-

Interaktionen involviert, wie Signaltransduktion, Transkription und RNA-Prozessierung, DNA-Reparatur, Zelladhäsion, Rekombination, Embryonalentwicklung usw. Das erste Beispiel eines LRR-Proteins, dessen Kristallstruktur aufgeklärt wurde, ist der Ribonuklease Inhibitor (RI). RI ist ein 456 As. großes Protein, das in mehreren Geweben vorhanden ist, es besteht aus 15 LRR und verhindert durch seine Bindung an die Ribonuklease den Verdau der RNS und reguliert so die Proteinsynthese in der Zelle. Die einzelnen Wiederholungen (Repeats) korrespondieren zu den  $\beta$ - $\alpha$ -Struktur-Einheiten, bilden ein hufeisenförmiges Molekül aus einem Innenkreis mit kurzen  $\beta$ -Faltblättern und einem dazu parallelverlaufenden Außenkreis mit  $\alpha$ -Helices (Kobe et Deisenhofer, 1993; 1995).

Inzwischen konnte auch die 3D-Struktur der ersten 242 As. von InlB aufgeklärt werden.

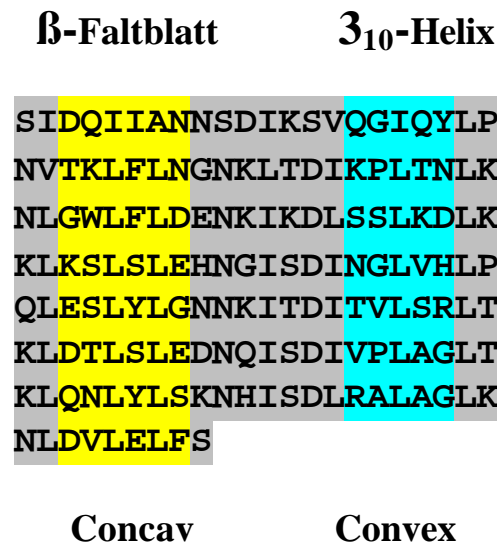


**Abb. 10:** Struktur der Leucin-Reichen-Repeats (position 77-242 As.) des InternalinB-Proteins aus *L. monocytogenes*. (nach Marino, 1999)



Die 22 As. der LRR der Internaline sind regelmäßig angeordnet. Die LRRs werden „in tandem“ von 7,5 mal wiederholt. Die 7,5 LRRs von InlB stellen eine gebogene "Komma"-Struktur dar (Abb. 10). Die LRR-Wiederholungen ähneln dem o.g. Ribonuklease-Inhibitor (RI) (Kobe, 1993; 1995), dem U2LRR-Fragment des kleinen Kernribonucleoproteins U2 und dem malp aktivierenden Protein der Ran GTPase (Hillig et al., 1999).





**Abb. 11:** Alignmentsequenz der InternalinB-LRR (77 bis 242 As.) aus *L. monocytogenes*  
 =  $\beta$ -Faltblätter und  =  $3_{10}$ -Helices (nach Marino, 1999).

Wie in dieser Abbildung dargestellt, besteht jeder LRR von InlB aus einem kurzen  $\beta$ -Faltblatt und einem entgegengesetzten antiparallelen Segment einer  $3_{10}$ -Helix. Die  $\beta$ -Faltblätter und die  $3_{10}$ -Helices sind durch spulartige Strukturen miteinander angeschlossen. Die  $\beta$ -Faltblätter bilden die „Concav“-Seite des Moleküls und die  $3_{10}$ -Helix die „Convex“-Seite und beherbergen die meisten Aminosäuren (14-17 Reste) der 22As. der LRR, die wahrscheinlich eine hohes Regulationssegment innerhalb des Moleküls bilden (Marino et al. 2000).

Weitere Mitglieder der Internalinfamilie wurden bei dem Tierpathogen *Listeria ivanovii* identifiziert und charakterisiert, es handelt sich um kleine sekretierte LRR-Proteine, die als i-InlC, i-InlD, i-InlF und i-InlE bezeichnet wurden und deren Transkription PrfA-abhängig ist. Bis jetzt konnte nur bei i-InlF und i-InlE eine Virulenz im Mausmodell beobachtet werden, aber deren genaue Funktion ist zur Zeit noch nicht bekannt (Engelbrecht et al., 1997; 1998).

Weitere LRR-Proteine konnten bei anderen pathogenen Bakterien gefunden werden, wie das YopM von *Yersinia pestis* und IpaH von *Shigella flexneri* (Leung et al., 1989; 1990), das TpLRR aus *Treponema pallidum* (Shevchenko et al., 1997), das filamentöse Hämagglutinin von *Bordetella pertussis* und das 98-kDa BspA-Protein von *Bacteroides forsythus* (BspA besteht aus 14 Wiederholungen „repeats“ von 23 As. Länge), das partiell Homologien zu Leucin-reichen Wiederholungen zeigt (Sharma et al., 1998). *Shigella flexneri*, dessen intrazellulärer Lebensstil eng mit *Listeria monocytogenes* verwandt ist, verfügt über mehrere Kopien von *ipaH* sowohl auf dem Chromosom als auch auf dem Virulenzplasmid (Buysse et al., 1987).

Es gibt einige wenige Beispiele von Multigenfamilien in der prokaryotischen Welt. Die pathogenen *Neisseria*-Arten (*Neisseria gonorrhoeae* und *N. meningitidis*) liefern ein gutes Beispiel von Mikroorganismen, die über Genfamilien verfügen. In *N. gonorrhoeae* MS11 wurden 11 verschiedene *opa*-Gene charakterisiert, jedes Gen kann unabhängig von dem anderen an- oder ausgeschaltet werden (Bhat et al., 1991 und 1992). Diese veränderlichen Proteine sind an Adhärenzfunktionen, wie in der Wechselwirkung mit humanen Leukozyten und Epithelzellen und der intergonococcalen Adhäsion, beteiligt.

**PROBLEMSTELLUNG UND ZIEL DIESER ARBEIT** ist die Identifizierung neuer LRR-Proteine und Untersuchungen zu deren Rolle in der Pathogenität von *L. monocytogenes* EGD-e. Weiterhin soll die Regulation neuer Internalinproteine und dem Internalinoperon (InlAB) und die Rolle des PrfA-Faktors hierbei untersucht werden.

### Ziel des ersten Teils dieser Arbeit

Der *inlFDE*-Locus mit neuen LRR-Genen soll vollständig kloniert und sequenziert werden, damit eine Analyse der Gene und deren Genprodukte hinsichtlich Genanordnung, Genomlokalisierung, Regulationselementen und konservierter /homologer Molekülabschnitte durchgeführt werden kann. Weiterhin soll mittels Homologieanalyse festgestellt werden, ob die Genprodukte InlFDE der Familie der LRR-Proteine von *L. monocytogenes* zuzuordnen sind, das heißt, ob sie außer den Leucin-reichen Repeats noch über weitere Merkmale wie ein N-terminales Signalpeptid, eine Spacer-Region und /oder einen C-terminalen Membrananker verfügen.

Man hat durch eine Subtraktionshybridisierung zwischen pathogenen und nicht pathogenen Listerien *L. monocytogenes*-spezifische DNA-Sequenzen identifiziert (Buske; Chen et al., 1993). Ein Ziel dieser Arbeit ist der Vergleich dieses Locus mit apathogenen Listerien (*L. innocua*), ob es sich bei diesem Gencluster um eine weitere, neu entdeckte *L. monocytogenes*-spezifische Determinante handelt und ob es Hinweise auf mögliche Transfermechanismen gibt.

Um zu untersuchen, ob es sich um Pathogenitätsfaktoren handelt, sollten stabile chromosomale Deletionsmutanten ohne polare Effekte in *L. monocytogenes* EGD-e in den einzelnen Genen und den gesamten Operon hergestellt und in Zellkulturen und im Mausinfektionsmodell getestet werden. Weiterhin sollten gezielte NotI-Schnittstellen in bekannten Pathogenitätsfaktoren auf dem Chromosom eingefügt werden, damit eine Kartierung des Genoms mittels PFGE im Rahmen des Genomprojektes von *L. monocytogenes* EGD-e am Institut für Medizinische Mikrobiologie in Gießen verwirklicht werden konnte (Zusammenarbeit mit Von Both).

Die transkriptionelle Regulation der Gene *inlFDE* sollte sowohl mittels Northern-Blots unter verschiedene Temperaturen als auch durch Reportergenstudien ( $\beta$ -Galaktosidase aus *B. stearothermophilus*) untersucht werden.

Zur Untersuchung der einzelnen Moleküle InlF, D, E sollte unter Verwendung eines rekombinanten Expressionssystems die Proteine in *E. coli* gereinigt werden. Diese gereinigten Proteine sollten zur Herstellung von Antikörpern dienen, um die Moleküle in *L. monocytogenes* zu detektieren. Weiterhin können die derart gereinigten Moleküle auch zur Aufklärung der 3D-Struktur dienen (Funktionsanalysen). Weiterhin ermöglichen diese Fusionsmoleküle die Herstellung von Affinitätschromatographiesäulen, um mögliche Wechselwirkung zwischen InlF, D, E und Wirtsmolekülen zu studieren.

### **Ziel des zweiten Teils dieser Arbeit**

Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit sollte die Regulation des *inlAB*-Operons, die PrfA-abhängig und PrfA-unabhängig erfolgt, genauer untersucht werden.

Frage: ist die PrfA- bzw. die PrfA-Box-abhängige Regulation für die Invasion von *L. monocytogenes* EGD-e notwendig?

Hierzu sollte die Expression des *inlAB*-Operons anhand von Deletionsmutanten untersucht werden, denen der Regulator PrfA fehlt, oder denen die *prfA*-Box vor dem *inlAB*-Operon fehlt bzw. substituiert wurde. Die Expression sollte durch mRNA-Studien erfolgen und die Genprodukte mittels Immunoblot detektiert werden. Weiterhin sollte die Mutanten im Zellkulturinvasionsversuch hinsichtlich ihrer Fähigkeit zur Invasion untersucht werden.

### 3. MATERIAL

#### 3.1 Bakterienstämme

##### 1. Listerien

*Listeria monocytogenes* (EGD-e): Serotyp 1/2a

*Listeria innocua* NCTC 11288: Serotyp 6a

*Listeria monocytogenes* EGD-e-Deletionsmutanten:

Bezeichnung	Herkunft	
$\Delta inlF$	diese Arbeit	
$\Delta inlD$	diese Arbeit	
$\Delta inlE$	diese Arbeit	
$\Delta inlFDE$	diese Arbeit	
$\Delta inlFDE$ in $\Delta inlAB\Delta irpA$	diese Arbeit	
$\Delta inlF$ in $\Delta inlAB\Delta irpA\Delta VGC$	diese Arbeit	Hergestellt für die Kartierung des Chromosoms von <i>Listeria monocytogenes</i> (siehe Von Both, 1999)
$\Delta inlD$ in $\Delta inlAB\Delta irpA\Delta VGC$	diese Arbeit	
$\Delta inlE$ in $\Delta inlAB\Delta irpA\Delta VGC$	diese Arbeit	
$\Delta inlFDE$ in $\Delta inlAB\Delta irpA\Delta VGC$	diese Arbeit	
$\Delta PprfA$ -Box in $\Delta actAplcB$	diese Arbeit	
$\Delta PprfA$ -Box in $\Delta inlFDE$	diese Arbeit	
$\Delta actAplcB$ in $\Delta inlFDE$	diese Arbeit	
$\Delta dapE$	diese Arbeit	
$\Delta PprfA$ -Box von <i>inlAB</i>	diese Arbeit	
Substitution <i>PprfA</i> -Box von <i>inlAB</i>	diese Arbeit	
$\Delta prfA2$	Domann/Zechel	
$\Delta inlAB2$	M. Hudel	

##### 2. E. coli

##### Genotyp

**INVaF'** (Invitrogen):

end, rec, hsdR17(r<sup>-k</sup>,m<sup>+k</sup>), supE44, *I*<sup>-</sup>, thi-1, gyrA, relA1,  $\Phi$ 80, lacZ $\alpha$   $\Delta$ (lacZYA-argF), deoR<sup>+</sup>, F<sup>-</sup>

**BL21** (Amersham Pharmacia Biotech):

F<sup>-</sup>, ompT, hsdS (rB<sup>-</sup>, rB<sup>-</sup>), gal

**DH10 $\beta$**  (Life Technologies):

F<sup>-</sup>, mcrA  $\Delta$ -(mrr hsdRMS-mcrBC),  $\Phi$ 80dlacZ $\Delta$ M15,  $\Delta$ lacX74, deoR, recA1, araD139,  $\Delta$ (ara,leu)7697, galU, galK,  $\lambda$ <sup>-</sup>, rpsL, endA1, nupG

#### 3.2. Zelllinien

Zelllinie	Zelltyp	Organ	Herkunft	Katalognummer
Caco-2	Epithel	Dickdarm	Mensch	DSM ACC 169
HeLa	Epithel	Gebärmutter	Mensch	DSM ACC 57

## 3.3. Oligonukleotide

Name	5'-3' Sequenz
adBgl-BamHI	GCTACAAAGCAAGCAGGATCCAGCGCAACAAAA
adBgl-NdeI	TCCTGTATTTGTATGCATATGAAAACTCCTTTTCT
adD-BamHI	GATGCAAAAACGGGTGGAAGTGAATGGGATCCCGCAACTAGCAAAATGCCAACTAGTG
adD-NdeI	CTGAATTCACCGTTTTTTCATATGCCCTCTCCTTTTATTTA
adE-BamHI	GGTACAAGTAACCCAAGGGATCCAGGAGGCAATACCAC
adE-NdeI	TGCTGTTTTGTTTTCTTTTCATATGACTATCTCCTTTAT
adF-BamHI	GAACATTAGAAGGATCCCGCAAGATTCATT
adF-NdeI	TTTTTCTCTGTTTCATATGATCGTCTCCTTATAATTTG
adG-BamHI	CGTCCATTTGATGATTTTGGGATCCTTATTTTACTA
adG-NdeI	ATTATTTTTAGATTTTCATATGAGTCTTTCCTTTCATT
adP60-BamHI	TCGATCATCATAATTCTGGATCCTTATATAACATCCTCCAT
adp60-NdeI	GTTGCTTTTTTTCATATTTCATATGACTCCTCTCTTTTTTTCAGA
adLacZ'	GTGTGGAATTGTGAGCGG
Bgl BamHIGST	GCTGCTGCTGGATCCCAATTGGAAGGCGCT
Bgl MunIGST	TCAAAGCCAATTGAGAGCCAGTGAG
BOXA+	TGAACATAAAGGGTAGAGGACGCGGCCGCGGATTCTTTTTTTGGAAAAATAGTT
BOXB+	AACTATTTTTCCAAAAAAGAATCCCGCGGCCGCTCTTACCCTTTATGTTCA
dapE A	TTGTTTGGGACATTTTCTCGGTAAC
dapE NotI A	GTCTAGGTCGTATTGTACCTTTGCGGCCGCAATACCATGTTTCAGCTA
DapE NotI B	TTTCCGGAACAACCGATGCGGCCGATTTACCAAAGCTAAGAA
G-1	CAGCCAGATCAAGTAGGCGTC
G-2	ACGGTCTTCCCGCTGTAGTGG
GSTBglII D1	GAGAGGGATTAGATCTAAACGGTGGAATTCAGT
GSTBglII D2	GGTTCGGGCAAGATCTATCACGCAGCCAACCGC
GSTBglII E1	AGATAGTTTAAGATCTAGAAACAAAACAGCATTAAG
GSTBglII E2	AGTATTGGCAAGATCTTTTGGGTAGGGATGAGCTC
GSTBglII F1	AGACGATAAAAGATCTCAGAGAAAAACCTCAGT
GSTBglII F2	TATCTTGGGAAGATCTTTATGGGTAAATGCAAGTC
GSTMunI F	GTATCTGTTACAATTGATTTTCCAGCCGCTATTTT
GSTMunI D	CGTAACTTCGTCAATTGCATCCGCTTTTCCGAGC
GSTMunI E	AATAGCAGCAATTGATCAATCGCATTC
inlDBglIIA	AAAGTAGATTACCAAGATCTGCTACAAGA
inlDBglII B	CGTAACTTCGTCTGTAGATCTGCTTTTCCGAGC
InlDNotI A	AAAATCACATTAATTGGCGGCCGCTGCGTGATGCTCTCTG
InlDNotI B	ACTTATCAAAGCTTGCGGCCGCAACCAGTAGCGCCAACGAAGG
inlDE BglIII1	CTGACGGCGTAGATCTAATGGGTTAC
inlDE BglIII2	AATAGCAGCAAGATCTCAATCGCATTC
inlDE1	GAGAATTGTCTGAGCTAGG
inlD1	AAGATAAACTAACAATTAAAGCTAACGAC
inlD2	GACGACAAGATTATTTTGATAAAAC
inlD5	GCGGAGAATTAGCGTCTGCTGTTCCCT
inlE1	GGAATAACAACAATAGAAGGATTGCAGT
inlE2'	ATCAACTACATCCATATGCCCTGA
inlE2	CAATACGACCTAGACAGAGCT
inlE3	GTTACGCAGATGATTTAAATGG
inlED2	GTAATTCACGGGCGCTTCT
inlED3	CGCTAATGCTGGATCCGTGA
inlED4	TGGGATGAAAGCTCAGGCAGAGAGT
inlED4'	CCTCAGTACTACATGTTTTACTTGTAGTGAC
inlE4	AACAGCATTAAAGAACTTTAGTC
inlE5	GATAAGAACTGCTCCTACA

Name	5'-3' Sequenz
inlE BglII A	AAAATTGCCAGCAGAGGAGATCTCATTATACGCGC
inlE NotI A	AGTAAAATTTCCGTTAATAGCGGCCGCGTGTCAATCACCGCTGC
inlE NotI B	GTCCAATTAATGCGGCCGCAAATGACAATAATTC
inlF BglII	GTACTGTTACATTAGATCTTCCAGCCGCTATTTT
inlF NotI A	AACTAATTCCCAAGATAGCGGCCGCTACAAGTAAAACATGT
inlF NotI B	TCCGACGAAAGCGGCCGCCACATTTGTAGGATGGT
inlG1+	AAATGTGCATATAGAGTGAC
inlG2+	TATAGAGTGACATCATTCGCGGGC
inlG3	CGGTTGTGTTATGAAGCCACT
inlG3 REV	TAGTGGCTTCATAACACAACCGTT
inlG-4A	CGCGACCTGTGGCGCTGCTTT
inlG-SP-ECORI	GTTATAAAAGATGGTCAGCGAATTCGCATCAATGGT
M100	GTAAACGACGGCCAGT
M101	CAGAAACAGCTATGAC
prfA box 2	AAGGAAAAAAGCGGCCGACCCTTTATGTTCAAAAT
prfA box 1	AAGGAAAAAAGCGGCCGCTTTTTTGGAAAAAATA
TH6	ATTCCCAGCTTCCACTTCTTTG
TH22	GAGACTATCACCGTGTCAACG
1323	CCCTAATCTATCCGCCTGAAGCGTTG
1317	GGAATGACGAGCTCATACAAACAATATGG
6516	ACGAACCAACTGCTCCAGCCAAGGAAGGTT

### 3.4. Vektoren

**pCRII** (Invitrogen):

acZ Gen, Sp6 Promotor, Multiple Klonierungstelle, T7 Promotor, F1 Origin, Kanamycin Resistenz, Ampicillin Resistenz, ColE1 Origin

**pAUL-A:** (Diplomarbeit Maria Hartl)

lacZ $\alpha$ , ori pMB9, oriRTs, Em<sup>r</sup>

**pGEX-6P-1:** (Amersham Pharmacia Biotech):

lac I<sup>q</sup>, ori pBR322, P tac, GST, Amp<sup>r</sup>

**pSOG13:** (Doktorarbeit S. Otten)

lacZ', cop<sup>R</sup>, rep<sup>R</sup>, ori ColE1, lacZ, bgaB, ermC

### 3.5. Plasmide

Plasmide	Vektor	Insert	Herkunft
pAD14	pCRII	<i>inlFDE</i>	diese Arbeit
pAD15	pCRII	<i>inlF</i>	diese Arbeit
pAD16	pCRII	<i>inlD</i>	diese Arbeit
pAD17	pCRII	<i>inlE</i>	diese Arbeit
pAD18	pCRII	<i>inlG</i>	diese Arbeit
pAD19	pCRII	<i>L. innocua</i> (intergenische Bereich <i>ascB-dapE</i> )	diese Arbeit
pAD21	pCRII	$\Delta inlFDE$ EGD-e	diese Arbeit
pAD22	pCRII	$\Delta inlF$ EGD-e	diese Arbeit
pAD23	pCRII	$\Delta inlD$ EGD-e	diese Arbeit
pAD24	pCRII	$\Delta inlE$ EGD-e	diese Arbeit
pAD25	pAUL-A	$\Delta inlFDE$ EGD-e	diese Arbeit
pAD26	pAUL-A	$\Delta inlF$ EGD-e	diese Arbeit
pAD27	pAUL-A	$\Delta inlD$ EGD-e	diese Arbeit
pAD28	pAUL-A	$\Delta inlE$ EGD-e	diese Arbeit
pAD29	pAUL-A	$\Delta PprfA$ -Box von <i>inlA</i> EGD-e	diese Arbeit
pAD30	pAUL-A	$\Delta dapE$ EGD-e-Chr	diese Arbeit
pAD31	pAUL-A	Subst. <i>PprfA</i> von <i>inlA</i>	diese Arbeit
pAD32	pAUL-A	$\Delta asd$ EGD-e	diese Arbeit
pAD33	pAUL-A	$\Delta dapG$ EGD-e	diese Arbeit
pAD34	pAUL-A	$\Delta dapA$ EGD-e	diese Arbeit
pAD34	pSOG13	Promotor von <i>inlF</i>	diese Arbeit
pAD34	pSOG13	Promotor von <i>inlD</i>	diese Arbeit
pAD34	pSOG13	Promotor von <i>inlE</i>	diese Arbeit
pAD34	pSOG13	Promotor von <i>inlG</i>	diese Arbeit
pAD34	pSOG13	Promotor von <i>bglA</i>	diese Arbeit
pAD34	pSOG13	Promotor von <i>p60</i>	diese Arbeit
pAD34	pGEX-2TK	<i>inlF</i> ohne S. peptide	diese Arbeit
pAD34	pGEX-2TK	<i>inlD</i> ohne S. peptide	diese Arbeit
pAD34	pGEX-2TK	<i>inlE</i> ohne S. peptide	diese Arbeit
pAD34	pGEX-6P1	<i>inlG</i> ohne S. peptide	diese Arbeit

### 3.6. Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen: Roche, Difco, Life Technologies, Merck, Amersham Pharmacia Biotech, Roth und Sigma bezogen.



### 3.7. Enzyme

Die Enzyme, die für diese Arbeit verwendet wurden, stammen von den Firmen: Amersham Pharmacia Biotech, Biolabs, Biozym, Life Technologies, Merck, New England Biolabs, Roche.

### 3.8. Antikörper

Anti-Kaninchen-InlF-Serum (polyklonal):	diese Arbeit
Anti-Kaninchen-InlD-Serum (polyklonal):	diese Arbeit
Anti-Kaninchen-InlE-Serum (polyklonal):	diese Arbeit
Anti-Kaninchen-InlB-Serum (polyklonal):	S. Müller
Anti-InlA L244 (monoklonal):	S. Müller
Alkalische Phosphatase-konjugierte Anti-Kaninchen-IgG:	Dianova
Alkalische Phosphatase-konjugierte Anti-Maus-IgG:	Dianova
M108 B11 ( <i>Listeria monocytogenes</i> , spezifisch):	GBF
Cy3-Anti-Maus IgG:	Dianova
Cy3-Anti-Kaninchen IgG:	Dianova
FITC-Phalloidin:	Dianova

### 3.9. Antibiotika und andere Zusätze:

	Arbeitskonzentration	Stammlösung
Ampicillin	100µg/ml	100mg/ml
Erythromycin	5µg/ml für Listerien 300µg/ml für <i>E. coli</i>	50mg/ml
X-Gal	40µg/ml	20mg/ml in 50% Dimethylformamid
IPTG	0.5µl/ml	100 mM

### 3.10 Medien und Agarplatten

#### 3.10.1. Listerien

##### Medien:

<b>BHI</b> (Brain Heart Infusion) (Life Technologies) :	38g BHI auf 1 L Aqua dest.
<b>BHI</b> (Brain Heart Infusion) (BD Biosciences) :	37g BHI auf 1 L Aqua dest.

**Agarplatten:****BHI-Platten:**

37g BHI  
10g Agar  
auf 1L Aqua dest.

**DM3-Platten:**

200ml 5% Agar  
500ml 1M Na-Succinat (Bernsteinsäure)  
100ml 5% Caseinhydrolysat (Pepton 140)  
60ml 10% Hefe-Extrakt  
100ml  $[K_2HPO_4(w/v3,5\%) + KH_2PO_4(w/v1,5\%)]$   
10ml 50% Glucose  
20ml 1M  $MgCl_2$   
10ml 5% BSA

**Alles getrennt autoklavieren: 12' bei 121°C,  
vor Gebrauch auf 50°C abkühlen lassen und  
mischen.**

**3.10.2. *E.coli*****Medien:****LB (Luria Bertani):**

10g Trypton  
5g Hefe-Extrakt  
10g NaCl  
auf 1L Aqua dest.

**Agar-Platten:**

Zu 1L LB-Medium werden 10g Agar gegeben.

**3.10.3 Zellkulturmedium:****- MEM (Minimal Essential Medium):**

Mit Earle's Salts, with L-Glutamin  
(Life Technologies)

**- FKS:**

100% Foetal Bovine Serum (Sigma)

**- L-Glutamin:**

100x; 29,3 mg/ml in Normal Saline (PAA  
Laboratories), Arbeitskonzentration: 200 mM

**- Hanks' Salt Solution (1x) :**

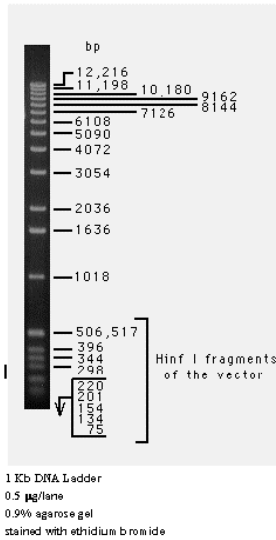
1X; enthält Calcium und Magnesium (Life  
Technologies)

**- Trypsin/EDTA**

1X; 0,5 g Trypsin (1:250)/l; 0,2 g EDTA/l in  
1X PBS (PAA Laboratories)

### 3.11. Größenmarker:

#### 3.11.1. DNA-Marker: (1 kb-Leiter von Life Technologies)

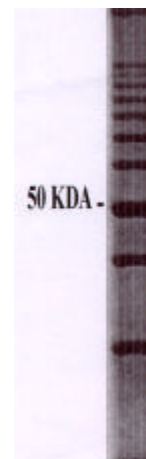


#### 3.11.2. DIG-RNA-Marker (Life Technologies):

**9 Fragmente:** 310, 438, 575, 1049, 1517, 1821, 2661, 4742, 6948 bp.

#### 3.11.3. Protein-Marker: (10 kDa von Life Technologies )

Bandennummer	Molekulargewicht (Da)
1	200,000
2	120,000
3	110,000
4	100,000
5	90,000
6	80,000
7	70,000
8	60,000
<b>9</b>	<b>50,000</b>
10	40,000
11	30,000
13	10,000



### 3.12. Geräte

Geräte	Firma
ALFexpress	Pharmacia
Autoklav	Wolf
Brutschränke	Heraeus
CO <sub>2</sub> -Brutschränke	Labotect
Eismaschine	Icematic F90 Compact Elektronik
Elektrophoresekammern	Eigenbau der Institutswerkstatt
Feinwaage	Mettler
Filme	Fuji-100 Röntgenfilme; Cronex 10S
Filmentwickler	Agfa
Fluoreszenzmikroskop	Zeiss
French Press	SLM AMINCO
Geiger-Müller-Zähler	FAG
Gelfotographie und Cybertech	Haiser und Mitsubishi
Gene-Quant	Pharmacia
Geltrockner	Eigenbau der Institutswerkstatt
Hybridisierungsöfen	Biometra
Kühlschränke	Bosch
Kamera	Nikon F 601 Vibro
Magnetrüher	Janke und Kunkel
Mikroskope	Zeiss
Mikrowelle	Moulinex
pH-Meter	WTW
Photometer	Pharmacia
Plattiergerät	BioSys, Autoplate 3000
Protein-Gelkammern	Biometra und Phase
Sequenzier-Gelkammern	ALFexpress von Pharmacia
Sterilbank	Karl Bleymehl Reinraumtechnik
Spannungsgeräte	Consort
Speedvac-Konzentrator	Bachhofer
Thermocycler	Perkin Elmer, Biomed
Thermoblöcke	Eigenbau der Institutswerkstatt
Tischzentrifugen	Heraeus
Ultraschallgerät	Branson Sonic Power Company
Ultrazentrifugen	Sorval
Wasserbäder	Infors AG und GFL

### 3.13 Computerprogramm

ALFwin, CASBA IV, Corel Draw, DNAsis, DNASTAR, Excel, FreeHand 8, Husar, Word, Power Point, Win- und Mac OS, Internet, data base searching usw.

## 4. METHODEN

### 4.1 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

<b>Lösungen:</b>	<b>10X TAC-Puffer =</b>	330mM	Tris-Acetat
		660mM	Kaliumacetat
		100mM	Magnesiumacetat
		5mM	DTT
		1mg/ml	Casein

Im allgemeinen werden 0,2-1,0 µg Plasmid-DNA bzw. 5-10 µg chromosomale DNA für einen Verdau eingesetzt. Weiterhin sind im Verdauungsansatz 1/10 Volumen 10X TAC-Puffer, Restriktionsenzyme (max. 1/10 Gesamtvolumen) und Wasser (Restvolumen) enthalten.

Der Reaktionsansatz wird 1-2 h bei Plasmid-DNA bzw. 1-18 h bei chromosomaler-DNA bei einer optimalen Temperatur von 37°C ( Temperatur ist Enzym-abhängig z.B.: SmaI 25°C, BssHI 58°C ) inkubiert und durch Zugabe von Probenpuffer (siehe 4.3) oder Phenolisieren abgestoppt.

### 4.2 Fällung von DNA mit Ethanol

Die DNA-Lösung wird in 1/10 Vol 3M Natriumacetat pH 4.9 und 2 Vol EtOH versetzt, gut gemischt und 30 min bei -70°C oder 2 Std bei -20°C ausgefällt. Durch 15 min Zentrifugation wird die DNA pelletiert, mit 70% EtOH gewaschen, getrocknet und in 1X TE aufgenommen.

### 4.3 Auftrennen von DNA-Fragmenten durch Agarosegelelektrophorese

#### Lösungen:

#### 10X TBE:

108g Tris  
55g Borsäure  
20ml 0.5M EDTA pH 8.3  
ad 1l Wasser

#### 10X TPE:

108g Tris  
15.5 ml 85% Phosphorsäure (1.679 g/ml)  
40 ml 0.5 EDTA pH 8.3  
ad 1l Wasser

#### Probenpuffer:

40% Saccharose  
Bromphenolblau

Das Auftrennen von DNA-Fragmenten erfolgt mittels Elektrophorese in Agarosegelen.

Die Agarose-Konzentration ist abhängig von der Länge der zur untersuchenden Fragmente. Durch Verwendung eines DNA-Markers bekannter Größe ist es möglich, die Länge von linearisierten DNA-Fragmenten zu bestimmen.

Für Plasmid-DNA werden 0.7-1.25%ige Agarosegele mit TBE-Puffer (Tris, Borate, EDTA) eingesetzt. Für chromosomale DNA werden 0.4-0.7%ige Agarosegele mit TPE (Tris, Phosphat, EDTA)-Puffer eingesetzt (das TPE-Gel wird zur besserer Auftrennung von größeren DNA-Fragmenten benötigt).

Die Agarose wird durch Kochen in TBE oder TPE-Puffer in Lösung gebracht, nach Abkühlen auf ca. 50°C mit EtBr (Endkonzentration: 0.5µg/ml) versetzt und auf eine abgedichtete Glasplatte mit eingesetzten Kämmen gegossen. Als Gelpuffer werden 1x TBE und auch 1x TPE als Laufpuffer verwendet. Die mit 1/10 Vol Stop-Puffer vermischten DNA-Proben werden in die Geltaschen geladen. Die Elektrophorese erfolgt bei TBE-Gelen 1-2 h bei 200V, bei TPE-Gelen ÜN bei 40V. Anschließend wird das Gel unter UV-Licht betrachtet und fotografiert.

<u>Zusammensetzung eines 0.8%igen TBE-Gels</u>		<u>Zusammensetzung eines 0.8%igen TPE-Gels</u>	
10X TBE	10ml	10X TPE	10ml
Agarose	0.8g	Agarose	0.8g
Ethidiumbromidlösung 1%	5µl	Ethidiumbromidlösung 1%	5µl
Wasser	90ml	Wasser	90ml

#### 4.4 Elution von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen

Diese Methode dient der Reinigung von bestimmten DNA-Fragmenten, die für eine Klonierung eingesetzt werden sollen.

Nach der Elektrophorese wird das gewünschte DNA-Fragment aus dem Agarosegel unter UV-Licht herausgeschnitten und in ein Eppendorf-Cap gegeben. Es wurde eine Methode von QIAGEN verwandt, die auf einem Kit basiert. Die verwendeten Puffer und Waschlösungen liegen den Reaktionskits bei. Die DNA-Bande wird mit einem Skalpell herausgeschnitten und in einem Eppendorfcap gewogen. Zu 100 mg Gel werden 300µl QX1-Puffer gegeben und für 10 min bei 50°C inkubiert. Die Probe wird dann über eine Säule geladen und für 60 sec bei 15000 rpm zentrifugiert. Für den Waschvorgang werden 0.75 ml PE-Puffer hinzugegeben und wieder für 1 min zentrifugiert. Danach wird für eine weitere Minute zentrifugiert, um den restlichen Puffer zu entfernen. Dann wird die Säule in ein neues Cap gesteckt, 50µl 1x TE-Puffer zugegeben und 1 min zentrifugiert. Das Eluat kann sofort weiter verwendet oder bei -20°C aufgehoben werden.

## 4.5 Ligation von DNA-Fragmenten

<b>Lösungen:</b>	<b>5X Ligationspuffer:</b>	50mM Tris-HCl pH 7.6
		25mM MgCl <sub>2</sub>
		25mM Dithiothreitol (DTT)
		2.5mM ATP
		200µg/ml Rinderserumalbumin (BSA)

Das Ziel dieser Methode ist die Verknüpfung von DNA-Fragmenten. Diese Verknüpfung wird mit Hilfe von DNA-Ligasen vermittelt, die die Bildung von Phosphodiester-Bindungen zwischen einer freien 5'-Phosphatgruppe und einer freien 3'-Hydroxylgruppe katalysieren.

Der Ligationsansatz enthält den linearisierten Vektor und die DNA-Fragmente im Verhältnis 1:3 oder 1:4. Für ein Gesamtvolumen von 20µl werden 4µl 5X Ligationspuffer (Life Technologies) und 1U/µl T4 DNA-Ligase (Life Technologies) zum Reaktionsansatz gegeben. Die Ligationsansatz erfolgt bei 14°C über Nacht im Wasserbad.

### 4.5.1 Direkte Klonierung von PCR-Produkten

Der TA-cloning™ Kit von Invitrogen ist für die direkte Klonierung von PCR-Produkten in einen speziell dafür konstruierten Vektor (pCRII) vorgesehen.

Da der pCRII-Vektor 3'-T-Überhänge an der Insertionsstelle enthält, brauchen die bei einer PCR entstehenden 3'-A-Überhänge (Template-unabhängige Aktivität der Taq-DNA-Polymerase) nicht zu blunt-Enden modifiziert werden.

Die TA Cloning™ Ligation erfolgt in einem molaren Verhältnis von 1:3 (Vektor 3.9 kb : PCR-Insert x kb).

Zu 25 ng pCRII-Vektor werden:	x µl PCR-Produkt
	1µl T4 DNA Ligase
	1µl 10X Ligationspuffer
	ad. 11µl Aqua bidest.

Die Ligationsansatz erfolgt bei 14°C über Nacht.

#### 4.6 Dephosphorylierung des Klonierungsvektors mit alkalischer Phosphatase

Diese Methode dient der Klonierung von DNA-Fragmenten in Klonierungsvektoren, die nur mit einem einzigen Enzym geschnitten sind. Durch die alkalische Phosphatase werden die 5'-Phosphatenden des linearisierten Vektors entfernt und die Rezirkularisierung des Vektors wird so verhindert.

Der linearisierte Vektor wird nach der Aufreinigung des Restriktionsverdaus (4.2-4.4) in 20µl Wasser aufgenommen.

+1/10 Volumen 10X CIP-Puffer (Boeringer Mannheim)

+1U/µl CIP (alkalische-Phosphatase) (Boehringer Mannheim).

Der Ansatz wird für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wird gestoppt durch Zugabe von 1/10 Volumen (200mmol) EGTA und Erhitzen auf 65°C für 10 min. Das Aufreinigen der Dephosphorylierungsreaktion erfolgt durch Phenolisierung. Das präzipitierte, gewaschene und getrocknete Pellet wird in 20µl Wasser aufgenommen.

#### 4.7 Phosphorylierung von PCR-Produkten (durch das Sure™ Clone Kit/Pharmacia)

Diese Methode hat als Ziel die Verknüpfung von PCR-Produkten, die auf Grund der unspezifischen Reaktion der Taq-DNA-Polymerase 3'-A-Überhänge besitzen. Mit Hilfe der 3'-5'-Exonukleaseaktivität des Klenowfragmentes werden die 3'-Überhänge entfernt. Die T4-Polynukleotidkinase phosphoryliert die 5'-Enden des so modifizierten PCR-Produktes.

##### 1-15µl des PCR-Produktes werden mit:

1µl Klenow-Fragment

2µl 10X Blunting Kinasing Buffer

1µl T4 PNK (Polynukleotidkinase)

ad Aqua. bides. (Gesamtvolumen beträgt 20µl).

Der Ansatz wird für 30 min bei 37°C inkubiert. Danach einmal phenolisiert, kurz abzentrifugiert und die wässrige Phase in ein frisches Cap gegeben. 500 Sephacryl® S-200-Resin werden auf eine Micro-Spin-Säule (in einem 1.5 ml Cap) gegeben. Nach einer Zentrifugation von 30 sek bei maximaler Geschwindigkeit wird der Durchfluss verworfen und die Säule in ein frisches Cap überführt. Die wässrige Phase, die das behandelte PCR-Produkt enthält, wird auf die Säule pipettiert und bei maximaler Geschwindigkeit für 30 sek. zentrifugiert. Der Durchfluss enthält das phosphorylierte und gereinigte PCR-Produkt, das nun für eine Ligationsreaktion mit einem anderen phosphorylierten und gereinigten PCR-Produkt oder Vektor eingesetzt werden kann.



#### 4.8 Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen (nach Hanahan et al., 1991)

<b>Lösungen:</b>	<b>SOB Medium (ohne <math>Mg^{2+}</math>):</b>	<b>CCMB 80:</b>
	20g Bacto-Tryptone	80mM $CaCl_2$
	5g Bacto-Yeast-Extrakt	20mM $MnCl_2$
	0.58g NaCl	10mM $MgCl_2$
	0.19g KCl	10mM Kaliumacetat, pH 7
		10% Glycerin

50ml SOB-Medium (ohne  $Mg^{2+}$ ) werden mit 1ml einer bei 37°C gewachsenen ÜN-Kultur beimpft (2:100 Verdünnung) und bis zu einer optischen Dichte = 550 nm von 0.3 bei einer Temperatur von 37°C angezogen.

Die Kultur wird in ein Greiner-Röhrchen überführt, 10 min auf Eis abgekühlt und 10-15 min bei 4°C und 2000-3000 rpm. abzentrifugiert. Das Pellet wird in 1/3 Vol (ca. 17ml) CCMB 80 vorsichtig aufgenommen und für weitere 20 min auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation nimmt man die Zellen in 1/12 Vol (ca. 4.2ml) CCMB 80 auf. Die nun kompetenten Zellen müssen sofort aufgebraucht oder in 200µl Aliquots in flüssigem Stickstoff eingefroren werden. Die Lagerung erfolgt bei -70°C.

#### 4.9 Transformation von Plasmiden in *E. coli*

<b>Lösungen:</b>	<b>SOC-Medium:</b>	20g Bacto Tryptone (2%)
		5g Bacto Yeast Extract (0.5%)
		0.58g NaCl (10mM)
		0.19g KCl (2.5mM)
		2.03g $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ (10mM)
		2.46g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (10mM)
		3.96g Glucose (20mM)
		add. 1L $H_2O$

Für die Untersuchung eines DNA-Abschnittes reicht das Ausgangsmaterial nicht aus. Es ist deshalb erforderlich, den gesuchten DNA-Abschnitt zu vervielfältigen. Da die Bakterien (*E. coli*) sehr rasch wachsen, kann das erwünschte DNA-Fragment in relativ kurzer Zeit in Bakterien (*E. coli*) vermehrt werden. 200µl kompetente Zellen werden mit dem Ligationsansatz (+ 8µl 0.5 M  $\beta$ -Mercapto-Ethanol für TA-Cloning™ Transformation) gemischt und für 30 min auf Eis inkubiert (Plasmide lagern sich an die Zellwand der Bakterien). Anschließend erfolgt ein Hitzeschock von 90 sec bei 42°C (Plasmide werden durch die Zelle aufgenommen) und sofort wieder für 2 min auf Eis. Zu dem

Transformationsansatz wird 800µl SOC-Medium gegeben (Stabilisieren der Zellen) und 1h bzw. 4h (bei Em-Resistenz) unter leichtem Schütteln bei 30°C inkubiert. Anschließend werden 100-200µl des Transformationsansatzes auf den entsprechenden Selektionsplatten (für TA-Cloning<sup>TM</sup> Transformation, auf LB+50µg/ml Ampicillin + X-Gal; ohne IPTG) ausplattiert und über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

#### 4.10 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

##### 4.10.1 Minipräparation (Wizard<sup>TM</sup> Minipreps von Promega)

###### Lösungen:

<b>Zell-Resuspensionspuffer:</b>	<b>Zell-Lysispuffer:</b>	<b>Wasch-Lösung:</b>
50mM Tris-HCl, pH 7.5	0.2M NaOH	200mM NaCl
10mM EDTA	1% SDS	20mM Tris-HCl, pH 7.5
100µg/ml RNase A		5mM EDTA
<b>Neutralisationspuffer:</b>	<b>TE-Puffer:</b>	verdünnen mit 95% Ethanol
1.32M Kaliumacetat	10mM Tris-HCl, PH 7.5	Ethanol-Endkonzentration liegt
pH 4.8	1mM EDTA	ungefähr bei 55%

Diese Methode ist geeignet um kleinere Mengen Plasmid-DNA zu gewinnen, zum Beispiel für das Restriktionsscreening und für die Transformation von Bakterien.

3ml einer Übernachtskultur wird abzentrifugiert (5 min, 13000 rpm). Das Pellet wird in 200µl Resuspensionspuffer resuspendiert. Dann wird 200µl Zell-Lysispuffer zugegeben und „Überkopf“ gemischt und 2 min stehengelassen. Anschließend wird 200µl Neutralisationspuffer dazu pipettiert und „Überkopf“ gemischt. Nach Zentrifugation (5 min, 15000 rpm) wird der Überstand in ein neues Cap gegeben (Überstand enthält das Plasmid), mit 1ml Resin gemischt und über eine Säule, die auf dem Vakuman (Saugsystem, das mittels Vakuum arbeitet und bei der Reinigung von Plamid-DNA von Proteinen, RNA, chromosomalen DNA usw. verwendet wird) angebracht worden ist, gereinigt. Die an das Resin gebundene DNA wird einmal mit 2ml Waschlösung gewaschen. Nachdem die Säule in ein frisches Cap überführt und durch einen Zentrifugationsschritt bei 15000 rpm, 20 sec getrocknet worden ist, erfolgt die Elution der Plasmid-DNA durch Zugabe von 50µl 1X TE-Puffer und Zentrifugation bei 15000rpm, 20 sec lang. Die Plasmid-DNA kann bei -20°C gelagert werden.

#### 4.10.2 Maxipräparation (Wizard<sup>TM</sup> Maxipreps von Promega)

Die verwendeten Puffer und Waschlösungen: siehe 4.10.1

Diese Methode wird angewandt um große Mengen von Plasmid-DNA zu gewinnen, das Versuchsprotokoll umfaßt fast die selben Schritte wie bei der Minipräparation.

Von einer Übernachtskultur werden 1 ml in 100 ml LB-Medium angeimpft und bebrütet bis die optische Dichte (= 600 nm) ca. 0.6-0.8 beträgt. Die 100 ml Zellkultur wird dann auf zwei 50 ml Greiner-Röhrchen verteilt und für 10 min bei 6000 rpm und Raumtemperatur in der Heraeus-Zentrifuge abzentrifugiert. Das Pellet wird in insgesamt 15 ml Resuspensionspuffer aufgenommen. Darauf wird 15 ml Lysispuffer dazu pipettiert und geschwenkt bis die Lösung klar und viskös wird. Danach wird 15 ml Neutralisationspuffer dazugegeben und gemischt. Anschließend wird für 10 min bei 6000 rpm und Raumtemperatur abzentrifugiert. Zum Überstand werden 0.5 Volumen Isopropanol gegeben und für 15 min bei 6000 rpm und RT zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Pellet in 2 ml 1x TE-Puffer aufgenommen. Danach wird 10 ml Resin dazugegeben und gut gemischt. Das Resin/DNA-Gemisch wird in eine Elutionssäule gegeben und in einem Vakuum abgezogen. Anschließend werden 13 ml Waschlösung zugesetzt und wieder durch Vakuum abgezogen. Weitere 12 ml Waschlösung werden dazu gegeben und durch Vakuum abgesaugt. Danach werden 5 ml 80%iger Ethanol für das Abwaschen des Rest-Resins verwendet. Nach erneutem Vakuum wird die Elutionssäule in ein 50 ml Greiner-Röhrchen gesteckt und 5 min bei 2500 rpm zentrifugiert. Das Röhrchen wird dann verworfen und das Resin noch mal 5 min durch Vakuum getrocknet. Anschließend wird die Elutionssäule in ein neues Röhrchen gesteckt und 1.5 ml vorgeheizten (65-70°C) TE-Puffer dazugegeben und 1 min stehengelassen. Danach wird 5 min bei 2500 rpm zentrifugiert. Das Eluat enthält das Plasmid und wird bei 4°C oder -20°C aufbewahrt.

#### 4.11 Isolierung von genomischer DNA aus Listerien

**GES-Reagenz:** 5M Guanidiumthiocyanat/GDTC (Sigma)  
100 mM EDTA (Stock: 0.5 M in ddWasser, pH 8.0)  
0.5% (v/v) Sarcosyl (Fluka, Stocklösung: 10%)

Zur EDTA-Stocklösung wird das abgewogene GDTC gegeben und durch Erwärmen bei 65°C gelöst. Hiernach wird zu der abgekühlten Lösung das Sarcosyl zugefügt, mit ddWasser aufgefüllt und bei RT lichtgeschützt gelagert.

20 ml einer ÜN-Kultur ( $OD_{600nm} = 2.0$ , 37°C) werden zu 1.5 ml-Aliquots aufgeteilt und bei 4000 rpm, 5 min bei RT zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Bakterienpellet in 0.5 ml 0.85% NaCl-Lösung resuspendiert. Die Bakterien werden bei 1200 rpm, RT für 5 min pelletiert,

der Überstand verworfen und in je 100 µl Lysozym (50 mg/ml in 1X TE-Puffer) aufgenommen. Nach der Inkubation bei 37°C für 30 min. und bei RT für weitere 5 min werden je 1 µl RNase-DNase frei (10 U/µl Boehringer Mannheim) hinzugegeben und wieder 5 min bei RT inkubiert. Die Lyse der Bakterien erfolgt durch Zugabe von je 0.5 ml GES-Reagenz, fünfmaligem vorsichtigen Invertieren und Inkubieren bei RT für 5 min. Die Proben werden dann 2 min auf Eis gestellt, je 250 µl kaltes 7.5 M Na-Acetat hinzugegeben, gemischt durch viermaliges Invertieren und wiederum für 10 min auf Eis gestellt. Zur Extraktion werden anschließend je 0.5 ml Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) dazugegeben und die Proben 15 min invertiert. Die obere, wässrige Phase wird nach der Zentrifugation (14000 rpm, 4°C, 15 min) mit abgeschnittenen Pipetten-Spitzen (um eine Scherung der chromosomalen DNA zu vermeiden) in jeweils ein neues Reaktionsgefäß (1.5 ml) überführt. Zur Präzipitation wird zu jeder Probe 0.5 ml Isopropanol gegeben, das Reaktionsgefäß in horizontale Lage gebracht und 1-2 min vorsichtig gedreht, wobei die ausfallende DNA als Schlieren sichtbar wird. Dann wird vorsichtig invertiert bis Luftblasen in der Lösung aufsteigen. Anschließend wird das Reaktionsgefäß für ca. 5 sec kräftig geschüttelt. Die ausgefallene DNA wird als Knäuel sichtbar. Die Proben werden bei 14000 rpm, 4°C für 5 min zentrifugiert, der Überstand verworfen und die DNA-Pellets vorsichtig 5X mit 1 ml kaltem 70% Ethanol gewaschen. Das Pellet wird im Speed-Vac-Konzentrator getrocknet und in je 100 µl 1X TE-Puffer ÜN bei RT gelöst.

#### **4.12 RNA-Isolierung aus Listerien mit RNeasy Midikit von Qiagen**

Die Isolierung der Gesamt-RNA wird mit den Komponenten des Kits der Firma Qiagen entsprechend den Anweisungen des Herstellers durchgeführt.

Benötigte Lösungen (keine näheren Angaben des Herstellers):

- RLT-Puffer,
- RW1-Puffer,
- RPE-Puffer,

Es wird ausschließlich mit DEPC-behandeltem Aqua.bidest. gearbeitet, um den Abbau der isolierten RNA zu verhindern.

0.1% DEPC-Wasser: 1 ml DEPC zu 1l Aqua bidest. pipettieren, ÜN unter dem Abzug rühren, autoklavieren.

**Set-Puffer:** 50 mM NaCl  
30 mM Tris/HCl  
5 mM EDTA, pH 8.0

**Lysepuffer:** 50 mM Tris/HCl, pH 6.5

Eine ÜN-Kultur von Listerien wird 1:100 in 20 ml BHI verdünnt (bzw. 1:50 für Anzucht bei 20°C) und bis zu einer  $OD_{600nm} = 0.8-1.0$  bei der entsprechenden Wachstumstemperatur inkubiert (OD wird je nach Transkriptmenge ermittelt).

Nach Zentrifugation (4000 rpm, 4°C, 10 min) wird das Zellpellet mit 10 ml SET-Puffer gewaschen und anschließend in 10 ml eiskaltem Aceton resuspendiert. Im Anschluss an eine Inkubation für 10 min auf Eis wird der Ansatz erneut zentrifugiert und das Pellet unter der Sterilbank getrocknet, bevor es in 1 ml Lysepuffer aufgenommen wird. 114 µl Proteinase K/Merck (20 mg/ml in DEPC sterilfiltrieren) und 56 µl Mutanolysin (5U/µl; Sigma), sowie 1-2 µl RNase-Inhibitor (40U/µl; RNasin/Promega) werden sofort hinzupipettiert. Die Suspension wird im Schüttelwasserbad (200 rpm) für ca. 15-20 min bei 37°C inkubiert, bis die Lösung klar ist.

Die folgenden Schritte erfolgen bei RT: Zur klaren Lösung werden zunächst 3.8 ml RLT-Lysepuffer (dem RLT-Puffer muß Mercaptoethanol zugesetzt werden) zugegeben und für 10 sec gevortext und anschließend werden 2.8 ml absoluter Ethanol hinzu pipettiert. Der Ansatz wird gemischt (Schwenken) und die Probe auf die Säule aufgetragen. Nach einer Zentrifugation von 5 min bei 5000 rpm wird der Durchfluss verworfen und 3.8 ml RWI auf die Säule gegeben.

Nach einer erneuten Zentrifugation werden 2.5 ml RPE-Puffer dazugegeben. Im Anschluss an eine Zentrifugation (2 min bei 5000 rpm) wird der Durchfluss verworfen und der letzte Schritt wiederholt, die Zentrifugation erfolgt dabei jedoch für 5 min bei 5000 rpm.

Nachdem die Säule nun in ein frisches Reaktionsgefäß überführt worden ist, erfolgt die Elution der RNA durch Zugabe von 250 µl DEPC-Wasser (1 min stehen lassen; Zentrifugation: 3 min, 5000 rpm). Die Elution kann ein zweites Mal mit 30 µl DEPC-Wasser wiederholt werden.

#### **4.13 Alkalischer Northern-Transfer von RNA-Fragmenten auf Nylonmembranen**

##### **4.13.1 Vorbereitung des Gels und der Membran**

**Formaldehydgel:** 3.9 g Agarose + 353 ml DEPC-Wasser  
3-5 min in der Mikrowelle lösen  
+ 30 ml 10X MOPS  
+ 16.5 ml Formaldehyd 37%



Wasser angefeuchteten positiv geladenen Nylonmembran (auf Gelgröße zurechtgeschnitten) bedeckt. Auf die Membran werden 3 bis 4 in DEPC-Wasser getränkte zurechtgeschnittene Whatmanpapiere gelegt (das Blot-Sandwich muss luftblasenfrei sein), die ihrerseits von einer ca. 5cm dicken Schicht Papierhandtücher überschichtet wird. Darauf wird eine Glasplatte gelegt und mit einem 1-2 kg schweren Gewicht beschwert. Der Puffer wird durch das Gel in die Papierhandtücher gesogen, und auf diese Weise werden die im Gel enthaltenen RNA-Fragmente auf die Membran übertragen. Der Transfer ist nach ca. 16 h beendet. Beim Abbau des Blots werden die Geltaschen auf der Membran markiert. Die Membran wird getrocknet und durch UV (310 nm) (2min von jeder Seite) die RNA fixiert.

#### **4.13.3 Hybridisierung der RNA mit nicht-radioaktiv markierten Sonden**

##### **4.13.3.1 Hybridisierung mit DIG-markierten Sonden und immunologischer Nachweis**

###### **Lösungen:**

###### **DIG-Easy-Hybridisierungslösung:**

Granulat in DEPC-Wasser lösen  
(Beschreibung im Begleitzettel des Kits)

###### **Maleinsäurepuffer:**

100mM Maleinsäure  
150mM NaCl  
pH 7.5 mit NaOH einstellen

###### **Waschlösung I:**

2X SSC  
0.1% SDS

###### **Waschlösung II:**

0.5X SSC  
0.1 SDS

###### **10% Blockierungspuffer:**

10g Blockingreagenz  
100ml Maleinsäurepuffer pH 7.5  
autoklavieren

###### **Vorschrift für Hybridisierung mit DIG-markierter Sonde:**

###### **Hybridisierung:**

- Die durch UV fixierte RNA auf der Membran wird in eine verschließbare Glasröhre gegeben und 20 ml/100 cm<sup>2</sup> DIG-Easy-Hybridisierungspuffer luftblasenfrei hinzugegeben.  
Mindestens 30 min (besser 1 Std.) bei 50°C vorhybridisieren.
- Prähybridisierungslösung entfernen.

- 3.5ml/100 cm<sup>2</sup> DIG-Easy-Hybridisierungspuffer zur Membran geben, plus 25 ng/ml denaturierter DIG-Sonde (Sonde bei 95°C für 10min denaturieren, anschließend sofort auf Eis).
- Hybridisieren bei 50°C über Nacht.

### **Waschen:**

- 2X 15 min bei Raumtemperatur mit Lösung I waschen.
- 2X 15 min bei Raumtemperatur mit Lösung II waschen.

### **Immunologischer Nachweis :**

**Anti-Digoxigenin-AP (alkalische-Phosphatase):** 1:5000 = 150 mU/ml verdünnen (ausreichend für 50 Blots, 10X 10 cm<sup>2</sup>).

Das Reagenz ist ein Anti-Digoxigenin-Antikörper vom Schaf, konjugiert mit alkalischer Phosphatase /AP).

Das Konjugat dient zum Nachweis Digoxigenin-markierter Verbindungen.

**AMPPD® :** 1:50 in 1% Blockierungslösung verdünnen, bei 4°C lagern  
(Mehrfachverwendungsmöglichkeit)

**AMPPD®** ist ein Chemilumineszenz-Substrat für alkalische Phosphatase. Durch enzymatische Dephosphorylierung akkumuliert das mäßig stabile Intermediärprodukt AMP-D. Dies resultiert in einer kinetischen Verzögerung, die dem Gleichgewichtszustand der Lichtemission vorausgeht.

Eine konstante Lichtemission wird nach 15 min bei pH 9.5 und 37°C erreicht. AMP-D zerfällt in Adamantanon und das „charge transfer“-angeregte Methymetaoxybenzoat-Anion, welches Licht emittiert. Die Lichtemission erfolgt mit konstanter Rate bei 477 nm in Form eines „Leuchtens“ (Bronstein, 1989).

**CSPD®**(C<sub>18</sub>H<sub>20</sub>ClO<sub>7</sub>PNa<sub>2</sub>): ist ein Chemilumineszenz-Substrat für die alkalische Phosphatase (genaue Beschreibung in Begleitzettel des Kits)

### **Vorschrift für die immunologische Detektionsreaktion:**

- Schale wechseln!!!
- Membran 1-5 min in Waschpuffer ( Maleinsäurepuffer + 0.3% Tween 20 ) equilibrieren.
- 30 min in 1% Blockierungslösung (10% ige Blockierungsstocklösung 1:10 mit Maleinsäurepuffer verdünnen) inkubieren.
- Verdünnen des Anti-DIG-Ap 1:10 000 in 1% Blockierungslösung.
- Inkubation der Membran für 30 min. in der Antikörperlösung.



- Membran 2X 15 min mit Waschpuffer ( Maleinsäurepuffer + 0.3% Tween 20) waschen.
- Membran 2-5 min in Detektionspuffer equilibrieren.
- Membran 5 min in 1:100 verdünnter **CSPD<sup>®</sup>**-Lösung (in Detektionspuffer) inkubieren.
- Membran aus Lösung nehmen, abtropfen lassen (nicht trocknen lassen) und zwischen Klarsichtfolie legen.
- 30 min bei RT in geschlossener Filmkassette inkubieren, anschließend Röntgenfilm auflegen. Abhängig von der gebundenen Sonde und Menge an DNA auf Blot ist nach 1 min bis zu mehreren Stunden der Film zu belichten und anschließend zu entwickeln.

#### 4.13.4 RNA Dot-Blot

Eine auf passende Größe zurechtgeschnittene positiv geladene Nylonmembran wird in DEPC-Wasser angefeuchtet und anschließend in eine Dot-Blot Apparatur eingelegt. Die RNA-Proben werden 10 min bei 65°C gekocht und sofort auf Eis gestellt. Die RNA-Proben werden in DEPC-Wasser verdünnt, um die vorhandenen Mengen abschätzen zu können.

An die Blot-Apparatur wird Vakuum angelegt und die Proben werden in die "Näpfe" pipettiert und durchgesaugt, wobei die Nukleinsäuren an der Membran hängen bleiben. Die Membran wird getrocknet und die RNA durch UV (310 nm, 2 min von jeder Seite) fixiert. Die Hybridisierung der RNA mit nicht-radioaktiv markierten DNA-Sonden sowie der immunologische Nachweis sind unter 4.14.3. beschrieben.

#### 4.14 Herstellung von Listerien-Protoplasten (Wünscher et al., 1990)

##### 2X SSM:

1 M Saccharose  
20mM Tris  
10mM MgCl<sub>2</sub>  
40mM Maleinsäure  
pH 6.8 mit NaOH  
12min autoklavieren

##### 5% BSA:

5g BSA/100ml H<sub>2</sub>O  
pH 7.5 mit NaOH einstellen

##### 4X Bacto-Penassay Broth (PAB):

16g Nutrien broth  
14g Bactopepton (Pepton 140)  
12.4g Hefe Extrakt  
ad 1 l H<sub>2</sub>O pH 6.8

##### 1X SMMP:

40 ml 4X PAB  
55ml 2X SMM  
5ml 5% BSA  
steril filtrieren

Eine 37°C Übernacht-Kultur von Listerien in BHI-0.2% Glycin wird 1/100 verdünnt (insgesamt 28 ml) und bis zu einer OD<sub>600nm</sub> = 0.7 weiter inkubiert. Nach der Zentrifugation (10 min bei 5000

rpm) werden die Zellen einmal mit Aqua. dest. gewaschen und anschließend in 1/10 Vol 1X SMMP mit 10mg/ml Lysozym (aus 100 mg Lysozym/ml 2X SMM als Stocklösung) aufgenommen. Die Zell-Suspension wird ÜN bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag werden die Protoplasten unter dem Mikroskop beobachtet und, nach erneuter Zentrifugation, wird das Pellet mit 1X SMMP gewaschen und dann in 1/10 Vol 1X SMMP gelöst. Die Protoplasten werden sofort eingesetzt oder portionsweise (300µl) bei -70°C gelagert.

#### 4.15 Transformation von Listerien-Protoplasten

##### DM3 Regenerationsplatten:

5%	Agar	200ml
1 M	Na-Succinat	500ml
5%	Caseinhydrolysat (Pepton 140)	100ml
10%	Yeast Extrakt	60ml
	K <sub>2</sub> HO <sub>4</sub> (3.5%)/KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (1.5%)	100ml
50%	Glucose	10ml
1 M	MgCl <sub>2</sub>	20ml
5%	BSA (kurz erwärmen)	10ml

##### Lösungen:

##### Fusogen:

40g	PEG 6000
50ml	2X SMM, pH 6.8
	ad 100ml H <sub>2</sub> O , 12 min
	autoklavieren

##### 1M Na-Succinat:

135.05g	Bernsteinsäure-Na-Salz
	ad 500ml Aqua. bidest. pH 7.3

Alle Einzelkomponenten getrennt autoklavieren und vor Gebrauch auf 50°C abkühlen und zusammenpipettieren. Anschließend wird vor dem Gießen der Platten Erythromycin (Endkonz. 5 µg/ml) hinzugegeben. Zu 300µl Listerien -Protoplasten werden zwischen 0.5 µg und 1.0 µg Plasmid-DNA gegeben. Nach Zugabe von 2ml Fusogen wird der Ansatz für genau 32 sec leicht geschwenkt und 1 min stehengelassen. Dazu werden 7ml frisches 1X SMMP (siehe Kapitel 4.13.) gegeben, der Ansatz wird wieder leicht geschwenkt und bei 5000 rpm für 20 min bei RT abzentrifugiert. Das Pellet wird erneut in 1ml 1X SMMP gelöst und zur phänotypischen Expression 3-5 h bei 30°C inkubiert. Je 200µl werden auf DM3-Platten ausplattiert. Die Platten werden zwischen 4-8 Tage im Brutschrank bei 30°C inkubiert.

#### 4.16 Polymerase-Ketten-Reaktion (Polymerase Chain Reaction, PCR)

Mittels eines Systems aufeinander folgender DNA-Synthesen kann ein DNA-Abschnitt vermehrt (amplifiziert) werden, ohne lebende Zellen wie Bakterien verwenden zu müssen. Da es sich um eine Serie von DNA-Polymerase-Reaktionen handelt, wird diese Technik Polymerase-Kettenreaktion genannt (Polymerase Chain Reaktion, PCR). Mit dieser 1985 eingeführten Methode kann ein DNA-Abschnitt, der ursprünglich nur in einer Kopie vorliegt, exponentiell angereichert werden, um in genügender Menge für Untersuchungen zur Verfügung zu stehen.

### 4.16.1 PCR

Zunächst wird der zu amplifizierende DNA-Abschnitt durch Erhitzen in Einzelstrang-DNA überführt (denaturiert). Diese dienen als Vorlage zur Synthese neuer DNA. Als Primer für die DNA-Synthese verwendet man synthetische Oligonukleotide. Jeder Verdopplungszyklus besteht aus drei zeitlich genau aufeinander abgestimmten Reaktionen, für die verschiedene Temperaturen erforderlich sind. Zunächst erfolgt die Denaturierung des zu vermehrenden DNA-Abschnitts (in Einzelstrang-DNA bringen), dann Abkühlung und Hybridisierung mit den Oligonukleotiden (Anheften der Primer), dann Inkubation mit DNA-Polymerase und den vier Desoxyribonukleotid-Triphosphaten (Auffüllreaktion), so dass neue DNA gebildet werden kann. Bei jedem Zyklus dient die DNA als Vorlage. Dadurch wird bei jedem Zyklus die DNA verdoppelt. Der nächste Zyklus beginnt mit erneutem Erhitzen, um DNA-Einzelstränge zu bilden, Abkühlung zur Anheftung des Primers, gefolgt von neuer DNA-Synthese. Durch Automatisierung ist es möglich, in kurzer Zeit (1-3 Stunden) über 30 Zyklen ablaufen zu lassen, so dass die Ausgangs-DNA in exponentieller Anzahl vervielfältigt wird.

<b>Lösugen:</b>	<b>Puffer A (10X):</b>	<b>dNTP-Mix (1.25 mM/dNTP):</b>
	200mM Tris-HCl, pH 8.3	12.5µl dTTP (100mM)
	20mM MgCl <sub>2</sub>	12.5µl dGTP (100mM)
	250mM KCl	12.5µl dATP (100mM)
	0.5% Tween 20	12.5µl dCTP (100mM)
	1mg/ml Gelatine	950µl Aqua bidest.

#### Bei einem PCR-Ansatz wird wie folgt zusammenpipettiert:

<b>Template:</b>	Als Template können Einzelkolonien, chromosomale DNA, cDNA oder Plasmid-DNA dienen.
<b>Primer:</b>	Jeweils 1µl (20 pmol) eines ``Sense``- und ``Antisense``-Primers werden zu dem Ansatz pipettiert.
<b>dNTP-Mix:</b>	4µl dNTP's.
<b>PCR-Puffer:</b>	10µl 10X PCR-Puffer.
<b>Taq-Polymerase:</b>	0.3µl entsprechen 1.5 U Enzym.
<b>Aqua. bidest:</b>	ad 100µl.

**Zeitraumen für die PCR-Reaktionsschritte:**

First Delay                      0-5      Minuten (94°C)

<b>Denaturierung</b>	<b>20-40</b>	<b>Sekunden (94°C)</b>	} 25-30X
<b>Hybridisierung</b>	<b>30-40</b>	<b>Sekunden (35°C-65°C)</b>	
<b>Auffühlreaktion</b>	<b>30</b>	<b>Sekunden bis einige Minuten (72°C)</b>	

Last Delay                      1-5      Sekunden bis einige Minuten 72°C)

**4.16.2 Amplifizierung von DNA-Fragmenten mittels Expand PCR-System High Fidelity (Roche)**

Das Expand PCR-System zeichnet sich durch seine hohe Kopiergenauigkeit bei der DNA-Amplifikation von PCR-Produkten bis zu 10 kb aus. Dafür ist ein Enzymmix aus Taq-Polymerase (hohe Amplifikationsrate) und *Pwo*-Polymerase ("Proofreading"-Aktivität) verantwortlich. Die DNA-Amplifikation wird, wie in der Anleitung des Herstellers beschrieben, durchgeführt.

**4.16.3 PCR mit DIG-Einbau (Roche)**

**DIG-PCR-Mix:**            12.5µl dGTP (100mmol/l))  
                                  12.5µl dATP (100mmol/l)  
                                  12.5µl dCTP (100mmol/l)  
                                  11.0µl dTTP (100mmol/l)  
                                  **156µl DIG-dUTP (100mmol/l)**  
                                  795.5µl H<sub>2</sub>O.  
                                  Lagerung: -20° C

Bei dieser Methode wird zusätzlich zu den verwendeten vier Desoxynukleotiden ein Digoxigenin-markiertes **Desoxy-Uridin-TriPhosphat (DIG-dUTP)** mit Taq-Polymerase während der PCR in den neu synthetisierten DNA-Strang eingebaut. Das auf diese Weise DIG-markierte PCR-Produkt kann anschließend mit DIG Luminescent Detection Kit für Nukleinsäuren auf Nylonmembranen nachgewiesen werden.

**Vorschrift:**

- Auf eine Nylonmembranen wird 1µl, 1µl(1:10) und 1µl(1:100) gereinigter PCR-Sonde aufgetragen
- Membran jeweils für 2 min. unter UV-Licht fixieren
- Membran 1-5 min in Waschpuffer ( Maleinsäurepuffer + 0.3% Tween 20 ) äquilibrieren.
- 30 min in 1% Blockierungslösung (10%ige Blockierungsstocklösung 1:10 mit Maleinsäurepuffer verdünnen) inkubieren.
- Verdünnen der Anti-Dig-Ap 1:10 000 in 1% Blockierungslösung.
- Inkubation der Membran in der Antikörperlösung für 30 min..
- Membran 2X 15 min mit Waschpuffer ( Maleinsäurepuffer+ 0.3% Tween 20) waschen.
- Membran 2-5 min in Detektionspuffer equilibrieren.
- Membran 5 min in 1:100 verdünnter CSPD®-Lösung (in Detektionspuffer) inkubieren.
- Membran aus Lösung nehmen, abtropfen lassen (nicht trocknen lassen) und zwischen Klarsichtfolie legen.
- 30 min bei RT in geschlossener Filmkassette inkubieren, anschließend Röntgenfilm auflegen. Je nach Sonde und Menge an DNA auf Blot, ist nach 1 min bis zu mehreren Stunden der Film zu entwickeln.

**4.16.4 Inverse PCR**

Die inverse PCR ist eine Methode die das gleiche Ziel wie ein “ chromosome walking” (S. Schäferkordt & T. Chakraborty) verfolgt, nämlich die unbekannte DNA-Sequenz, die sich an einer bekannten DNA-Sequenz anschließt, in einen Plasmidvektor zu klonieren und zu sequenzieren. Die chromosomale DNA von *Listeria monocytogenes* wird mit einer Restriktionsendonuklease z. B. HindIII geschnitten. Dabei entstehen viele unterschiedliche HindIII-Fragmente. In der bekannten Sequenz befindet sich eine HindIII-Restriktionsschnittstelle, wird aber in unterschiedlichen Entfernungen von HindIII-Restriktionsschnittstellen im Bereich der unbekannten DNA-Sequenz flankiert. Dieses geschnittene DNA-Fragment wird religiert und anschließend eine PCR mit den entsprechenden Oligos aus der bekannten Sequenz heraus durchgeführt. Es entsteht ein lineares PCR-Fragment einer spezifischen Größe, dessen Enden bekannte DNA-Sequenzen aufweisen. Die Sequenz der dazwischenliegenden DNA ist unbekannt und sollte sequenziert werden.

#### **4.17 Spektrophotometrische Bestimmung von Nukleinsäure mit GeneQuant (Pharmacia)**

Die Qualität der isolierten Nukleinsäure wird durch spektrophotometrische Messung bei 260 und 280 nm bestimmt. Der gemessene Wert bei 260 nm erlaubt die Kalkulation der Konzentration der Nukleinsäure in der Probe. Eine OD von 1 entspricht ungefähr 50 µg/ml doppelsträngiger DNA bzw. 40 µg/ml einzelsträngiger RNA. Das Verhältnis der gemessenen Werte  $OD_{260}/OD_{280}$  lässt Rückschlüsse auf die Reinheit der Nukleinsäure zu. Optimale Werte ergeben für DNA ein Verhältnis von 1.8 und für RNA ein Verhältnis von 2.0. Die Nukleinsäure wird je 1:10 verdünnt und gegen den Referenzwert gemessen.

#### **4.18 Automatische DNA-Sequenzanalyse (ALFexpress von Pharmacia)**

Das automatische Sequenziergerät ALFexpress von Pharmacia dient zur Bestimmung der Basensequenzabfolge von DNA-Molekülen. Das Detektionssystem beruht auf einem Helium-Neon-Laser (633 nm). Der Laser regt DNA-Moleküle zur Fluoreszenz an, die mit dem Carbocyaninfarbstoff Cy5 markiert sind. Diese markierten Moleküle werden mit einem 6% PAA-Sequenziergel elektrophoretisch aufgetrennt. Das Fluoreszenzsignal wird von einer Photodiode aufgenommen und von einer Analysesoftware ausgewertet.

##### **4.18.1 Sequenziergel und Laufparameter**

Für die Sequenzierung der DNA-Moleküle wurde ein 6% Sequenziergel (FMC, Hydrolink-LongRanger) hergestellt und die Elektrophorese mit 0.5% X TBE-Laufpuffer bei 1500 V, 60 mA, 25 W, sampling intervall von 2 bei 55°C für 800 min durchgeführt.

##### **4.18.1.1 „Cycle Sequencing“ mit Cy5-fluoreszenz-markierten Oligonukleotiden:**

Die Sequenzierung von Plasmiden und DNA-Fragmenten mit markierten Primern wurde mit "Thermo Sequenase fluorescent labelled primer cycle sequencing kit" mit 7-deaza-dGTP von Amersham durchgeführt. Diese zyklische Sequenziermethode hat den Vorteil, dass mit einer hitzestabilen DNA-Polymerase eine lineare Vermehrung der Ziel-DNA stattfindet. Dazu sind als Vorteile der Methode der Einsatz von geringen Mengen an Plasmid, Cosmid oder PCR-Produkten durch Amplifikation der Ziel-DNA und die gute Auflösung von GC-reichen und AT-reichen Kompressionen durch die zyklische Denaturierung, Anlagerung und Vermehrung bei hohen Temperaturen zu nennen.

**Reaktionsbedingungen:**

1- 5 min 95°C (first delay)

2-	30 sec 98°C (Denaturierung)
3-	40 sec 60°C (Hybridisierung)

} 25X

4- 5 min 60°C (last delay)

Im Anschluss an die Sequenzierreaktion werden zu jedem einzelnen Ansatz 5 µl Sequenzierauftragspuffer gemischt und bei -20°C eingefroren. Die Sequenzierung wird, wie in der Anleitung des Herstellers beschrieben, durchgeführt.

**4.18.1.2 Sequenzierung von Plasmiden mit unmarkierten Primern**

Für die Sequenzierung von Plasmiden mit unmarkierten Primern wurde der AutoRead Sequencing Kit in Kombination mit dem dATP Labelling Mix von Pharmacia verwendet. Bei der isothermen Reaktion bei 37°C wird der Sequenzierprimer am 3'-Ende verlängert und zufällig durch Cy5-dATP markiert und das Plasmid mit T7 DNA-Polymerase nach der Kettenabbruch-Methode sequenziert. Bei der Sequenzreaktion wurden 40-100 pmol Primer und durchschnittlich 5 µg DNA eingesetzt. Die Sequenzierung wird, wie in der Anleitung des Herstellers beschrieben, durchgeführt.

**4.19 Herstellung chromosomaler Deletionsmutanten in *L. monocytogenes***

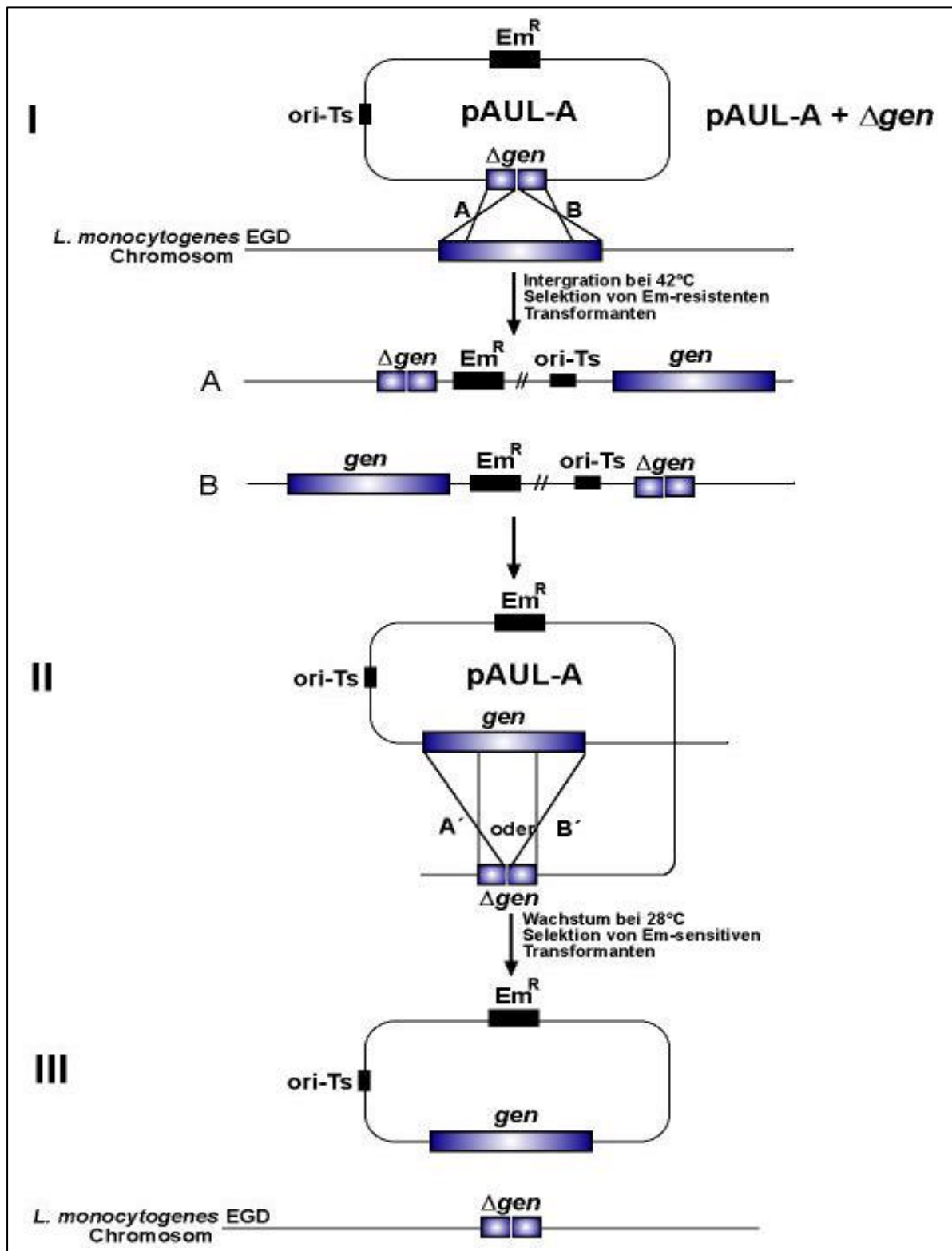
Zur Herstellung einer chromosomalen Deletionsmutante wurden in einer PCR zwei DNA-Fragmente so amplifiziert, dass die zusammengesetzten PCR-Produkte eine „in-frame“ Deletion beinhalten.

Zwei DNA-Fragmente wurden für diese PCR mit entsprechenden Oligonukleotidpaaren amplifiziert und  $\overline{\text{X}}$  ligiert. Am nächsten Tag wurden die ligierten Fragmente selektiv amplifiziert und in den **pCRII**-Vektor kloniert. Das Insert des neuen rekombinanten Plasmids wurde mit den entsprechenden Enzymen in dem Suizid-Vektor **pAUL-A**, dessen Replikation aufgrund eines Temperatur-sensitiven Origins nur bei niedrigen Temperaturen erfolgt, umklont. Das entstandene rekombinante Plasmid wurde in *L. monocytogenes* EGD-e-Protoplasten transformiert.

Die Transformanten werden einem Temperatursprung von 30°C auf 42°C ausgesetzt. Bei dieser erhöhten Temperatur kann sich das Plasmid aufgrund des ts-Replikons nicht mehr replizieren und versucht sich dadurch zu „retten“, dass es in das Chromosom durch homologe Rekombination integriert. Die resultierende Deletionsmutante beinhaltet sowohl das intakte als auch das deletierte Allel. Das Rausspringen des Plasmids (Allel-Austausch oder Excision) vom Chromosom erfolgte

durch eine zweite homologe Rekombination, wobei entweder der wiederhergestellte Wildtyp oder die Deletionsmutante entstanden. Die Excision des Plasmids (Allel-Austausch) aus dem Chromosom erfolgte folgendermaßen: Eine Kultur wird bei permissiven Bedingungen (30°C) ohne Selektionsdruck (ohne Em) in 10 ml BHI ÜN inkubiert. Am nächsten Tag wird die Kultur 1 : 1000 in BHI verdünnt und bis zu einer  $OD_{600nm} = 0.3-0.5$  bei 30°C wachengelassen. Danach wird die Kultur 1 : 20 in BHI/5Em Medium verdünnt und für 2 h bei 30°C geschüttelt. Es wird Ampicillin (200µg/ml) dazupipettiert und ÜN bei 30°C inkubiert. Nach der ÜN-Inkubation wird die Kultur in Stufen zu  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  in BHI verdünnt und jeweils 100 µl auf BHI-Platte ausplattiert. Die gewachsenen Kolonien werden jeweils auf eine BHI-Platten und eine BHI-Platte mit 5µg/ml Erythromycin übertragen und die erhaltenen Erythromycin-sensitiven Listerien werden in einer PCR auf die Deletion hin überprüft (siehe Abb. 12).





**Abb.12:** Schematische Darstellung der Konstruktion einer Deletionsmutante in *L. monocytogenes* EGD.

In **I**: ist die aus der homologen Rekombination des Plasmids pAULA+ $\Delta gen$  in das Chromosom von *L. monocytogenes* hervorgegangene Insertionsmutante dargestellt, die sowohl das intakte als auch das deletierte Gen enthält. **II**: zeigt die homologe Rekombination bei der permissiven Temperatur von 28°C die zur Excision des Plasmids führt (**III**).

## **4.20 Aufbereiten von Listerien -Kulturen**

### **4.20.1 Präparation von Überstandsproteinen**

Eine 20 ml ÜN-Kultur von Listerien wird für 15 min bei 6000 rpm, 4°C abzentrifugiert. Der Kulturüberstand wird mit 10% TCA 2 h oder ÜN bei 4°C in Eiswasser gefällt. Die gefällten Proteine werden durch Zentrifugation bei 4°C, 6000 rpm, 20 min pelletiert und das Pellet 2-3 mal mit 10 ml Aceton gewaschen. Nach dem Waschen wird das Pellet getrocknet, in 1/100 des Ausgangsvolums an 1M Tris/HCl, pH 9.0 gelöst und mit 1 Vol 2X Probenpuffer aufgekocht. Davon werden 20µl der Probe auf das Gel aufgetragen.

### **4.20.2 Herstellung von SDS-Extrakten**

Eine 20 ml ÜN-Kultur von Listerien wird für 15 min bei 6000 rpm abzentrifugiert. Das Pellet wird in 2/100 des Ausgangsvolums an 2% SDS resuspendiert und für 30 min bei 37°C im Schüttelbad inkubiert. Dann wird 5 min bei 15000 rpm zentrifugiert und der Überstand in 50µl 8X Probenpuffer aufgenommen.

## **4.21 Aufbereiten von *E. coli* -Zellkulturen**

### **4.21.1 Herstellung von Zytoplasma-Extrakten**

500µl Probe werden für 5 min bei 10000 rpm abzentrifugiert. Das Pellet wird einmal mit 1X PBS gewaschen und in 50 µl 2X Probenpuffer aufgenommen und bei 95°C, 5 min aufgekocht. Dann wird 5 min bei 15000 rpm zentrifugiert und vom Überstand 5-10µl aufgetragen.

## **4.22 Auftrennen von Proteinen mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese**

Proteine lassen sich leicht durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese auftrennen. Bei dieser Technik löst man die zu untersuchende Struktur zunächst in einer 1%igen Lösung des Detergens Natrium-Dodecylsulfat (englisch: Sodium dodecylsulfate, SDS), welches die meisten Protein-Protein- und Lipid-Protein-Wechselwirkungen unterbindet. Anschließend wird das Gemisch auf ein SDS-enhaltendes Polyacrylamidgel aufgetragen und darin einige Stunden einem elektrischen Feld ausgesetzt. In solchen Gelen hängt die elektrophoretische Beweglichkeit vieler Proteine von ihrem Molekulargewicht und nicht, - wie in Abwesenheit von SDS -, von ihrer Nettoladung ab, da die wesentlich stärkere Ladung von SDS die des Proteins, an das es gebunden wird, nicht mehr

wirksam werden lässt. Färbt man nach dem Lauf das Gel mit einem Farbstoff, wie z. B. Coomassie Blue an, wird eine Reihe von Banden sichtbar.

### Lösungen:

**4X Trenngelpuffer:** 1.5 M Tris/HCl, pH 8.8

**4X Sammelgelpuffer:** 0.5 M Tris/HCl, pH 6.8

### 10X SDS-Laufpuffer:

30.3g Tris

144g Glycin

20g SDS

ad 1l Aqua. bidest.

### Coomassie R250:

0.2% Coomassie R250

45% Methanol

10% Eisessig

lange rühren lassen, filtrieren.

### 2X Probenpuffer:

0.5 M Tris/HCl, pH 6.5

10% SDS

22% Glycerin

10%  $\beta$ -Mercaptoethanol

8 M Harnstoff

0.25% Bromphenolblau

### Blitzentfärber:

400ml Methanol

100ml Eisessig

ad 1l Aqua. bidest.

### ÜN-Entfärber:

100ml Methanol

150ml Eisessig

ad 2l Aqua. bidest

### Zusammensetzung eines Polyacrylamidgels:

#### Trenngel:

(für 2 Gele)

	7.5%	10%	12%	15%
<b>H<sub>2</sub>O</b>	7.4ml	6.1ml	5.1ml	4.7ml
<b>1.5 M Tris, pH 8.8</b>	3.8ml	3.8ml	3.8ml	3.8ml
<b>Acrylamid (30%)</b>	3.8ml	5ml	6ml	10ml
<b>10% SDS</b>	150 $\mu$ l	150 $\mu$ l	150 $\mu$ l	0.2ml
<b>TEMED</b>	20 $\mu$ l	20 $\mu$ l	20 $\mu$ l	15 $\mu$ l
<b>25% APS</b>	20 $\mu$ l	20 $\mu$ l	20 $\mu$ l	20 $\mu$ l

**Sammelgel:**

(für 2 Gele)

<b>H<sub>2</sub>O</b>	2.9ml
<b>0.5 M Tris, pH 6.8</b>	1.26ml
<b>Acrylamid (30%)</b>	0.85ml
<b>10% SDS</b>	50µl
<b>TEMED</b>	10µl
<b>25% APS</b>	10µl

Die Trenngel-Lösung wird zwischen zwei gut gereinigte Glasplatten, die mit 1 mm Spacer auseinandergehalten sind, bis auf 3 cm unter den Rand gegossen. Die Trenngel-Lösung wird vorsichtig mit Wasser überschichtet. Nach vollständiger Polymerisation wird das Wasser entfernt und das Trenngel mit der Sammelgel-Lösung überschichtet und anschliessend der Kamm zwischen die Glasplatten eingeführt. Vor dem Auftragen werden die Proteinproben in 2X Probenpuffer für 5-7min bei 95°C gekocht und auf Eis abgekühlt. Die Elektrophorese erfolgt mit 1X SDS-Laufpuffer bei 150V/200 mA für ca. 1.5 h. Nach der Elektrophorese wird das Gel auf eine Membran übertragen oder für ca. 20 min in der Coomassie-Lösung gefärbt (schwenken). Das Entfärben des Gels erfolgt entweder innerhalb von 1-2 h oder über Nacht.

**4.23 Transfer von Proteinen auf Nitrocellulosefilter (Western-Blot):****Lösungen:****10X Blotpuffer:**

58g Tris  
 29g Glycin  
 3.7g SDS  
 ad 1l Aqua. bidest.

**1X Blotpuffer:**

50ml 10X Blotpuffer  
 150ml Methanol  
 300ml Aqua. bidest.

Der Transfer von Proteinen aus dem SDS-GEL auf Blotmembran erfolgt nach dem halb-trockenen Verfahren (Kyhe-Anderson, 1984). Whatmanpapier und Nitrocellulosefilter werden auf Trenngelgröße zurechtgeschnitten. Die Blotmembran wurde 5 min mit Methanol benetzt und die Whatmanpapiere kurz in Blotpuffer äquilibriert. Die einzelnen Lagen müssen luftblasenfrei geschichtet werden: Anode/2 Lagen Whatman-Papier 3mm/Immobilon-Membran/SDS-Gel/2 Lagen Whatmanpapier /Kathode. Der Transfer erfolgt für 2 h bei 30 V, 300 mA.

#### 4.24 Färbung des Nitrocellulosefilters mit Ponceau-S

**Lösungen:**      2g    Ponceau-S  
                      30g    TCA  
                      30g    Sulfosalicylsäure  
                      ad 100ml Aqua. bidest.

Ponceau-S: 1:10 verdünnt in Wasser.

Zur Überprüfung, ob der Transfer der Proteine erfolgreich war, wird die Membran 1 min bei RT in Ponceau-Lösung zur Färbung geschwenkt. Der Farbstoff bindet reversibel an die Proteinbanden und wird anschließend durch Schwenken in Wasser entfernt.

#### 4.25 Entwicklung des Westernblot-Nitrocellulosefilters mit Antikörpern

**Lösungen:**

**10X TBS:**

10mM    Tris  
 0.9%    NaCl  
 pH 7.5 mit HCl

**Glycinpuffer**

0.1M    Glycin  
 1mM    ZnCl  
 1mM    MgCl<sub>2</sub>  
 mit dist. Wasser  
 auf 1l füllen  
 pH 10

**1X TBS/Tween:**

Zugabe von 0.1% Tween 20  
 zu 1X TBS.

Zunächst wird die Membran mindestens 2 h bei RT mit 3% BSA in TBS/Tween abgesättigt. Die Inkubation mit dem ersten Antikörper erfolgt für 2 h bei RT. Alkalische Phosphatase-gekoppelte Sekundärantikörper (Anti-Kaninchen: IgG) werden 1:1000 verdünnt und ebenfalls 2 h bei RT inkubiert. Nach jedem Inkubationsschritt wird die Membran 3X mit TBS/Tween gewaschen.

Die Membran wird in Glycinpuffer äquilibriert und die Detektion erfolgt durch Zugabe von 1 mg/ml BCIP (5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat). Die Umsetzung des Substrats BCIP durch die alkalische Phosphatase lässt die Banden gut sichtbar werden. Die Reaktion wird durch Spülung mit Wasser abgestoppt.

#### 4.26 Expression und Aufreinigung von Proteinen durch “Glutathion-S-Transferase (GST) Gen-Fusionssystem” (Amersham Pharmacia Biotech)

Zur Untersuchung eines Proteins sollte dieses in ausreichendem Maße und rein vorhanden sein. Mit Hilfe von Expressionsvektoren wie z.B. pGEX-2TK oder pGEX-6P1 von Amersham Pharmacia Biotech sollte die rekombinante Überproduktion des Proteins durchgeführt werden. Das “Glutathion-S-Transferase (GST) Gen -Fusionssystem” von Amersham Pharmacia Biotech dient der Expression und der Aufreinigung von Fusionsproteinen in *E. coli*. Exprimierte GST-Fusionsproteine können über Affinitäts-Chromatographie mit Glutathion Sepharose 4B als spezifisches Substrat aufgereinigt werden. Die Spaltung des fusionierten Proteins des an Glutathion Sepharose gekoppeltes GST-Anteils ist über eine spezifische Protease möglich. Im Fall von Thrombin, dessen Erkennungsmotiv zwischen Epitop und Zielprotein vorliegt, bezahlt man das Abspalten des Tags leider mit einer Kontamination der Proteinpräparation mit der Protease, die dann wiederum entfernt werden muss. Das Problem wurde besonders elegant mit der PreScission™ Protease gelöst: Das ist eine ihrerseits mit GST fusionierte hochspezifische Protease, die somit ebenfalls an der Säule bindet, während das Target-Protein “abgeschnitten” und eluiert wird.

##### 4.26.1 Induktion und Überexpression

Zunächst kloniert man sein Gen als Fusion mit Epitopsequenzen (GST) in den Expressionsvektor pGEX. Anschließend wird das Konstrukt in *E. coli* BL21 transformiert. Für die Überexpression werden 10 ml LB + 100µg/ml Ampicillin mit dem *E. coli*-Stamm BL21, der das rekombinante Plasmid enthält, beimpft und ÜN bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wird die Kultur 1/100 in 1 l LB + 100µg/ml Ampicillin verdünnt und bis zu einer  $OD_{600nm} = 0.6-0.9$  inkubiert. Anschließend erfolgt die Induktion mit 1 mM IPTG (Endkonzentration) für 3-5 h. 1 ml der induzierten Kultur mit rekombinantem Plasmid bzw. mit Vektor ohne Insert als Kontrolle werden entnommen, abzentrifugiert (10000rpm, 5 min) und in 100µl 2 x Probenpuffer + 8 M Harnstoff aufgenommen (siehe Kapitel 4.20.1). Die zwei Proben werden auf ein SDS-Gel aufgetragen, um zu überprüfen, ob die Protein-Induktion erfolgreich war.

##### 4.26.2 Cytoplasmaextraktion bzw. Reinigung des GST-Fusionsproteins

Zur Reinigung des Fusionsproteins wird die induzierte Kultur (1000 ml) für 10 min bei 6000rpm 4°C, pelletiert.

- Zellpellet wird mit 1 X PBS gewaschen.
- Das Pellet wird in 20 ml 1 X PBS aufgenommen.
- Der Aufschluß der Bakterien erfolgt in der French Press bei einem Druck von 17000psi.
- Das Lysat wird für 10 min bei 15000 rpm, 4°C, abzentrifugiert, der Überstand in einen neuen Behälter überführt.
- Zum Überstand wird 1 ml 50% G-Sepharose 4B zugegeben und bei RT für 30 min sanft gemischt.
- Für 5 min bei 1700 rpm abzentrifugieren.
- Vom Überstand werden 10 µl in ein frisches Cap überführt (Proteine, die nicht gebunden haben)
- Das Pellet wird 3-5 X mit 1 X PBS gewaschen.
- Zum gewaschenen Pellet wird eine bestimmte Menge an Protease im dazugehörigen Puffer (siehe Beschreibungsbegleitzettel) zugegeben und ÜN bei 4°C sanft gemischt (Abspalten des Tags).
- Für 5 min bei 1700 rpm, 4°C, zentrifugiert und der Überstand in einen frischen Behälter überführt.
- Vom Überstand “gereinigtes Protein” werden 20 µl entnommen und in 5µl 5X Probenpuffer aufgenommen (ebenfalls zu den nicht gebundenen Proteinen).
- Für 7 min kochen.
- Analyse mittels SDS-PAGE.

#### 4.27 Proteinbestimmung mittels BCA-Assay von Pierce

**Reagenz A:** Natriumcarbonat  
 Natriumbicarbonat  
 BCA-Entwicklungsreagenz  
 Natriumtartrat in 0.1 N NaOH

**Reagenz B:** 4%ige Kupfersulfat-  
 -Lösung in ddH<sub>2</sub>O

Zur Proteinbestimmung dient das “BCA Protein Assay Reagent” (Pierce, Illinois). Das Prinzip der Methode (nach Biuret) beruht auf der quantitativen Reduktion von Cu<sup>2+</sup> zu Cu<sup>+</sup> durch das Protein, und anschließender Reaktion der einwertigen Kupferionen mit jeweils zwei Bicinchonininsäure (BCA)-Molekülen zu einem wasserlöslichen Komplex, welches ein Absorptionsmaximum bei 562 nm hat.

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wird als Eichreihe eine Verdünnungsreihe von Proteinkonzentration zwischen 1200µg/ml bis 200µg/ml erstellt. Als Referenzwert dient Wasser. 50 Anteile Lösung A werden mit einem Anteil Lösung B gemischt. Jeweils 200 µl der Reagenzlösung werden in die Aussparungen einer 96 Well Mikrotiterplatte pipettiert und 10 µl der

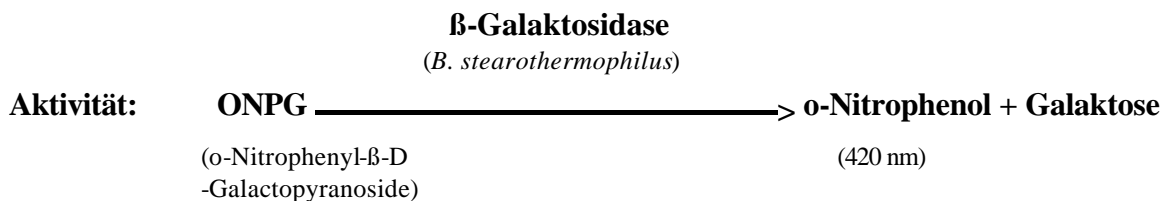
zu bestimmenden Proteinlösung dazugegeben. Die Lösungen werden gut gemischt und 30 Minuten bei 37°C (bzw. 60°C) inkubiert. Die Absorption wird anschließend bei 562 nm gegen den Referenzwert in ELISA-Reader gemessen. Anhand der Standarddeichkurve kann der Proteingehalt ermittelt werden.

#### 4.28 Enzymaktivitätsnachweis in *L. monocytogenes* (β-Galactosidase- Aktivität)

**Phosphatpuffer:** 0.1 M Na-Phosphat (pH 7.0) **Stop-Puffer:** 1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>

**Z-Puffer:** 0.1 M Na-Phosphat, pH 7.0  
10 mM KCl  
1 mM MgSO<sub>4</sub>  
50 mM Mercaptoethanol

**ONPG-Lösung:** 4 mg ONPG/1ml Phosphatpuffer



Zur Analyse von Promotoraktivitäten sollte als Reportergen eine hitzestabile β-Galaktosidase aus *Bacillus stearothermophilus* verwendet werden. Die Aktivität wird durch standardisierte Hydrolyse eines Galaktosidase-spezifischen Substrates bestimmt, das nach Spaltung einen gelben Farbumschlag aufweist. Es handelt sich um das farblose o-Nitrophenyl-β-D-glycopyranosid, dessen Hydrolyseprodukt o-Nitrophenol gelb ist.

Die Detektion der β-Galaktosidase-Aktivität erfolgte nach Lyse der rekombinanten Listerien. Die Lyse der Bakterien erfolgt nach der Methode von Martin Loessner mit einem spezifischen Phagenlysin gegen *L. monocytogenes*.

**Lyse-Puffer:** 20 mM Tris-HCl      **Lysin HPL 118** (4U/μl)  
2-5 mM MgCl<sub>2</sub>  
0.05 - 0.1% TritonX-100



1 ml einer Listerienkultur (ca.  $1-3 \times 10^8$  Zellen) mit dem rekombinanten Plasmid wird für 5 min bei 6000 rpm abzentrifugiert. Das Pellet wird 1 X mit ddWasser gewaschen und nochmal abzentrifugiert. Das Pellet wird in flüssigen Stickstoff eingefroren. Die Lyse erfolgt indem man 25 µl HPL 118 (1 : 10) zu 225 Lyse-Puffer gibt. Die Lyse der Bakterien ist nach ca. 30 min abgeschlossen.

### **β-Galaktosidase-Aktivitätsversuch**

- Ein Greiner-Röhrchen (12 X 75mm) mit 0.9 ml Z-Puffer befüllen.
- Zugabe von 0.1 ml Bakterienlysats.
- Erhitzen auf 60°C.
- Zugabe von 0.2 ml ONPG-Lösung, gut mischen (Endvolum 1.2 ml), für 30 min. bei **60°C** (Hitze stabile β-Galaktosidase aus *B. stearothermophilus*) im Wasserbad erhitzen.
- Reaktionsstop durch Zugabe von 0.5 ml 1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, um die β-Galaktosidase zu inaktivieren.
- Die Messung der Aktivität erfolgt bei OD<sub>420nm</sub>.

### **4.29 Infektionsversuch von eukaryotischen Zelllinien mit Listerien**

<b>Lösungen:</b>	<b>10 x PBS:</b>	80	g	NaCl
		2	g	KCl
		7.6	g	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> X 2H <sub>2</sub> O
		2	g	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
		ad 1 l ddH <sub>2</sub> O, pH 7.4 mit NaOH		

Eine ÜN-Kultur von Listerien wird 1 : 50 in 10 ml BHI verdünnt und bei 37°C bis zu einer OD<sub>600nm</sub> = 0.8-1.0 weiter inkubiert. 1 ml Kultur ( aus der logarithmischen Phase) wird für 2 min bei 8000 rpm zentrifugiert und der Überstand vollständig entfernt. Das Pellet wird 1X mit 1 ml MEM-Medium gewaschen. Das gewaschene Pellet wird in 1ml MEM-Medium gelöst. 8µl des Inokulums werden auf die Zellen gegeben und vorsichtig gemischt. Die Zellen werden 1 h bei 37°C in 5% CO<sub>2</sub>-Schränk inkubiert und anschließend das Medium abgezogen und durch frisches Medium mit 50 µg/ml Gentamycin ersetzt. Gentamycin tötet extrazelluläre Listerien, so daß nur die intrazellulären Bakterien überleben können. Je nach Fragestellung werden die infizierten Zellen für bestimmte Zeiträume, in der Regel 3 h, weiter inkubiert. Das Medium wird entfernt und 3X mit 1X PBS gewaschen. Um die Infektion der Zellen zu quantifizieren, werden diese für 20 Minuten bei Raumtemperatur mit 1ml einer 0.2% Triton X-100 Lösung inkubiert. Nach dieser Permeabilisierung wird die Suspension aus Bakterien und eukaryotischen Zellen zehnmal mit einer Pipette durchmischt und je nach Stamm in 1 X PBS verdünnt. Sowohl Bakterienkultur (Inokulum) als auch die

Suspension (inviadierte Listerien) werden auf BHI-Platten mit dem Autoplate 3000 ausplattiert und ÜN bei 37°C inkubiert. Die Anzahl der erhaltenen Kolonien können entweder entsprechend der Herstelleranleitung manuell oder mit der Software des CASBA IV ausgewertet werden.

Um die Infektion mikroskopisch zu beurteilen, werden die Zellen, die auf Deckgläschen gewachsen sind fixiert, indem sie für 15 min mit 3,7% (v/v) Formaldehyd in PBS inkubiert werden. Anschließend wird zu den Zellen 0,2%ige Triton X-100-Lösung pipettiert und für 1 min bei RT inkubiert (Permeabilisierung der Zellen).

#### **4.30 Immunofluoreszenzfärbung**

Moviol mit Ausbleichschutz: 0.1 g DABCO (Sigma)/ml Moviol

Parallel zum Infektionsversuch wird ein mit Zellen beschichtetes Deckgläschen infiziert. Statt einer Tritonbehandlung werden diese Zellen mit 500µl 3.7% Formaldehyd (in 1X PBS verdünnt) 5 min bei RT fixiert. Die so vorbereiteten Zellen werden mit 1x PBS gewaschen und zum Permeabilisieren der Zellmembran der Zellen 2 min mit 500 µl 0.2% Triton X-100 (in 1x PBS verdünnt) behandelt. Es folgt ein Waschschriff mit 1ml 1x PBS. Dazu werden 15 µl Primärantikörper "M108 B11" gegeben und für 30 min bei 37°C in einer feuchten Kammer inkubiert. Die Antikörperlösung wird dreimal mit 1X PBS abgespült und mit dem FITC-markierten Sekundärantikörpern Cy3-Anti-Maus IgG (1:100 verdünnt; 15µl pro Deckgläschen) gefärbt. Nach einer 30 minütigen Inkubation bei 37°C wird der Objektträger erneut 3X kurz mit 1X PBS abgespült. Die Deckgläschen werden nach dem Färben mit 4µl Moviol eingebettet und nach 15-30 min mit Nagellack versiegelt. Die Immunfluoreszenz wird im Fluoreszenzmikroskop ausgewertet.

#### **4.31 Mausinfektion**

Die Mausinfektionsversuche mit Listerien-Stämmen wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Ayub Darji von der GBF in Braunschweig durchgeführt. Weibliche Balb/C-Mäuse im Alter zwischen 4-6 Wochen wurden intravenös (Schwanzvene) mit  $6 \times 10^3$  Bakterien infiziert. Dazu wurden 3 Mäuse pro Gruppe verwendet. Drei Tage später wurden die Mäuse geopfert und die Zahl der Bakterien im Leber und Milz aus jeder Maus gezählt.

#### **4.32 Herstellung polyklonaler Antikörper**

Für die Herstellung polyklonaler Antikörper wurden 2-6 Monate alte Kaninchen verwendet. Zur Grund-Immunisierung wurden 160µg gereinigte Proteine in 0.8%ige NaCl-Lösung zu einem Endvolum von 400 µl aufgenommen und mit 400 µl komplettem Freudschen Adjuvant homogenisiert und dem Kaninchen subkutan an 6 verschiedenen Stellen injiziert. Im Abstand von jeweils 2 Wochen nach der Grundimmunisierung erfolgen 4 weitere Immunisierungen, versetzt mit inkomplettem Freudschen Adjuvant. Zur Kontrolle des Antikörpertiters wird jeweils 7-10 Tage nach den Injektionen Blut aus der Ohrvene mit Hilfe von Xylol abgenommen, als Serum aufbereitet und auf einem Westernblot getestet. Ist der Antikörpertiter in Ordnung werden die Kaninchen ausgeblutet (Kehlschnitt). Das Serum wurde mit  $\text{NaN}_3$  versetzt, aliquotiert und bei  $-20^\circ\text{C}$  oder  $-70^\circ\text{C}$  gelagert.

#### **4.33 Bestimmung der optischen Dichte einer Bakterienkultur**

Zur Bestimmung der optischen Dichte einer Bakterienkultur wird 1 ml der angewachsenen Bakterienkultur in eine Küvette gegeben und im Photometer bei 600 nm gemessen ( $=\text{OD}_{600}$ ). Als Leerwert dient das Medium, in welchem die Bakterien angezüchtet werden.

#### **4.34 Anlegen von Glycerinkonserven**

Von einer exponentiell gewachsenen Bakterienkultur werden 1 ml in ein steriles Einfriergefäß pipettiert. Nach Zugabe von 0.9ml 50% Glycerin werden die Glycerinkonserven durchmischt und bei  $-20^\circ\text{C}$  bzw.  $-80^\circ\text{C}$  gelagert.

## 5. ERGEBNISSE

### TEIL I:

#### **Identifizierung und Charakterisierung neuer LRR-Proteine aus *L. monocytogenes* EGD-e:**

##### **Der *inlFDE*-Locus und das *inlG*-Gen**

#### **5.1 Klonierung und Sequenzierung des *inlFDE*-Locus und dessen flankierender Bereiche**

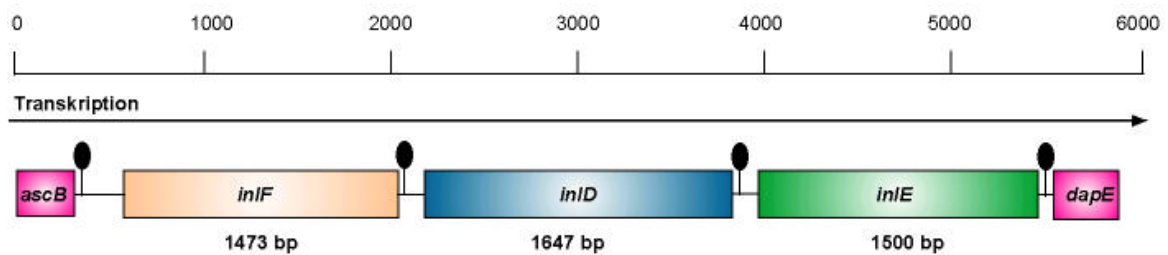
Durch eine Subtraktionshybridisierung zwischen pathogenen und nicht pathogenen Listerien wurden *L. monocytogenes*-spezifische DNA-Sequenzen identifiziert (Chen et al., 1993). Eine dieser Sequenzen besaß signifikante Homologien zu den Leucin-reichen Repeats (LRR) von *InlA/B*.

In der vorliegenden Arbeit wurden diese kurzen, bekannten DNA-Sequenzen herangezogen, um das komplette korrespondierende Gen inklusive flankierender Sequenzen mittels inverser PCR und „chromosome walking“ von *L. monocytogenes* EGD-e zu klonieren. Durch diese Arbeit konnte der *inlFDE*-Locus vollständig kloniert und sequenziert werden.

Die gewonnene Aminosäuresequenz wurde mit den Aminosäuren von in Datenbanken deponierten Proteinen verglichen und es konnte gezeigt werden, dass es sich hierbei um eine neue Leucin-reichen Repeats (LRR) Proteinfamilie aus *L. monocytogenes* EGD-e handelte.

Datenbankanalysen ergaben, dass der *inlFDE*-Locus drei Leseraster enthält, die für 490, 548 und 499 Aminosäuren große Proteine kodierten, die signifikante Homologien zu den Zellwand-gebundenen Internalinen *InlA/B* und dem sekretierten *IrpA* besaßen. Derartige Internaline mit den Leucin-reichen Repeats (LRR) besitzen die Fähigkeit, wie z.B. im Fall von *inlA* und *inlB*, die Invasion in nicht-professionelle eukaryotische Zellkulturen zu vermitteln.

Der *inlFDE*-Locus wird von den beiden Haushaltsgenen 6 Phospho- $\beta$ -Glukosidase und Succinyl-Diaminopimelat Desuccinylase, flankiert. Alle in diesem Genomabschnitt vorhandenen Gene werden in einer Richtung transkribiert.



**Abb.13:** Schematische Darstellung der *inlFDE*-Operon von *Listeria monocytogenes* EGD-e  
*ascB* und *dapE* = Haushaltsgene. ● = Terminator

### 5.1.1 Sequenzanalyse des *inlFDE*-Locus und der korrespondierenden Genprodukte

Die folgenden Daten wurden mit Hilfe des Programms HUSAR (Heidelberg Unix Sequence Analysis Resources) gewonnen und sind ausführlich im Anhang dargestellt. Eine Transkriptionseinheit besitzt mindestens folgende charakteristische Merkmale, die für eine erfolgreiche Transkription und Translation erforderlich sind:

- Eine Promotor Region, die aus einer **-35 Box** (siehe Map) und einer **-10 Box** (siehe Anhang) besteht. Diese Boxen liegen 35 bzw. 10 Nukleotidbasenpaare stromaufwärts (in 5'Richtung) des Beginns des Translationsstartes, charakterisiert durch ein ATG-Kodon. Diese beiden Boxen werden auch als "CAT-Box" (nach den beteiligten Sequenzen CAT benannt) und als "TATA-Box" bzw. Pribnow-Box (Pribnow, 1975) bezeichnet.
- Eine **Ribosomenbindungstelle** (als **RBS** auf der Sequenz gekennzeichnet), die zur Initiation der Proteinbiosynthese wichtig ist. Das Ribosom bindet an die mRNA aufgrund einer Basenpaarung zwischen einem streng konservierten Bereich nahe des 3' Endes der 16-rRNA und einem komplementären Bereich der mRNA, der etwa 7 Basen vor dem Startcodon AUG liegt. Dieser entsprechende Bereich auf der mRNA besteht aus einem Hexamer und ist als Shine-Dalgarno-Sequenz bekannt (Lewin, 1991; Shine et Dalgarno, 1975).
- Ein **Startcodon** für die Transkription (als **ATG** auf der Sequenz gekennzeichnet)
- Eine **Terminator**-Sequenz, die die Transkription zum Stillstand bringt.

Die Funktion der Termination und Antitermination ermöglicht den Bakterien, Transkriptionseinheiten monocistronisch und/oder polycistronisch abzulesen. Eine computergestützte Analyse von Genen, die physikalisch auf dem Genom angeordnet sind, gibt wichtige Hinweise auf die mögliche Regulation/Transkription dieses DNA-Abschnittes.

Die Bakterien besitzen kurz nach dem Stopcodon eines ORF's zwei invertierte Sequenzwiederholungen (Repeats), die durch eine kurze Sequenz getrennt sind. Kommt es zur Basenpaarung innerhalb der invertierten „Repeats“ der mRNA, so entstehen Haarnadeln, die aus Stamm und Schleife bestehen (Adhya et Gottesman, 1978; Platt, 1986).

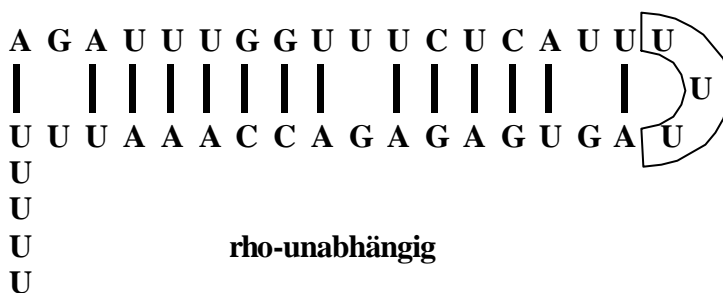
Man unterscheidet allgemein zwischen zwei verschiedenen Terminatoren:

- Rho-unabhängige Terminatoren
- Rho-abhängige Terminatoren

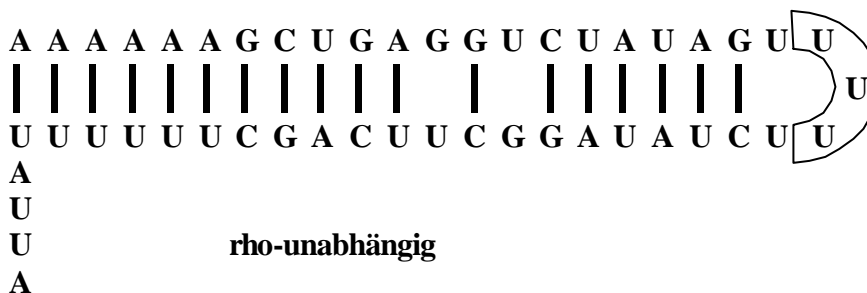
An Rho-unabhängigen Terminatoren oder einfachen Terminatoren kann das Enzym RNA-Polymerase ohne zusätzlichen Faktor terminieren. Diese Terminatoren besitzen die Form einer Haarnadel und eine Folge mehrerer Uracils (ca. 6-8). Der Stamm der Haarnadel kann länger (ca. 20bp) oder kürzer (ca. 5bp) sein und besitzt GC-reiche Regionen.

Rho-abhängige Terminatoren benötigen bestimmte Faktoren wie das Protein Rho, um die RNA-Polymerase zu stoppen. Sie bestehen ebenfalls aus Stamm und Schleife, sind nicht unbedingt GC-reich und ihnen folgt keine Serie an Uracils.

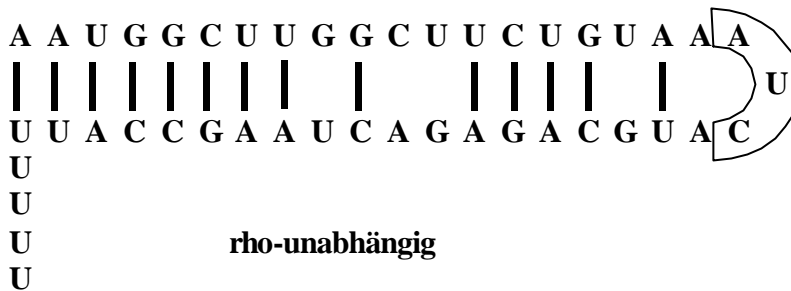
**Abb. 14:** Sequenz des putativen Terminators (1965bp-1999bp, in gelb dargestellt im Anhang) der *inlF*-mRNA bei *L. monocytogenes* EGD-e



**Abb. 15:** Sequenz des putativen Terminators (3746bp-3790bp, in gelb dargestellt im Anhang) der *inlD*-mRNA bei *L. monocytogenes* EGD-e

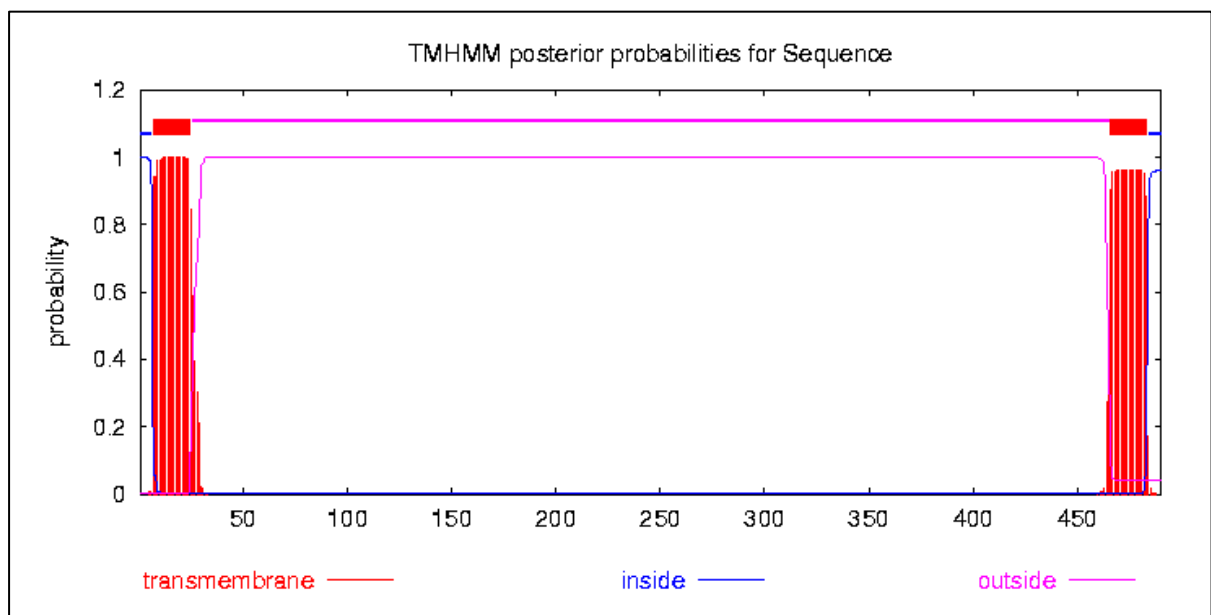


**Abb. 16:** Sequenz des putativen Terminators (5455bp-5495bp, in gelb dargestellt im Anhang) der *inlE*-mRNA bei *L. monocytogenes* EGD-e



### Charakterisierung der Proteinsegmente in der Primärsequenz von InlF, D und E

Zur Identifizierung möglicher Transmembransegmente innerhalb der Internaline F, D, E und G, bzw. ob die Internaline möglicherweise in der Zellwand verankert sind oder gar in den Überstand sezerniert werden, wurde die Primärsequenz der neuen Internaline mittels des Computerprogramms TMHMM<sup>1</sup> (v. 2,0) vom CBS (Centre of Biological Sequence Analysis) analysiert.



**Abb. 17:** Analyse der Proteinsegmente in der Primärsequenz von InlF<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Verfügbar unter: [www.cbs.dtu.dk/services/](http://www.cbs.dtu.dk/services/)

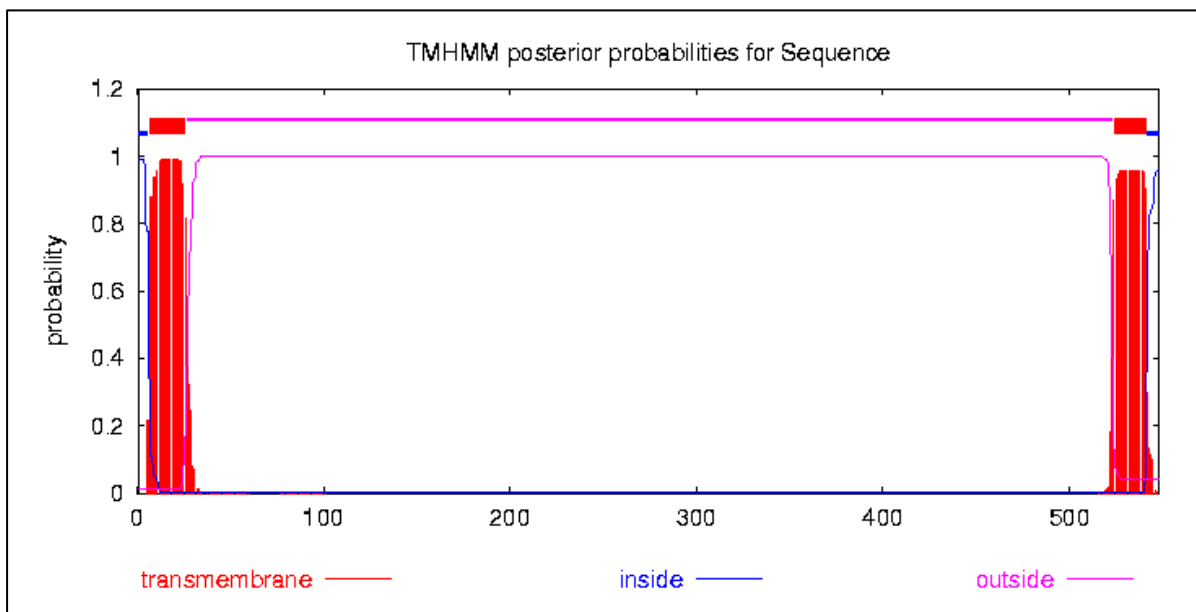
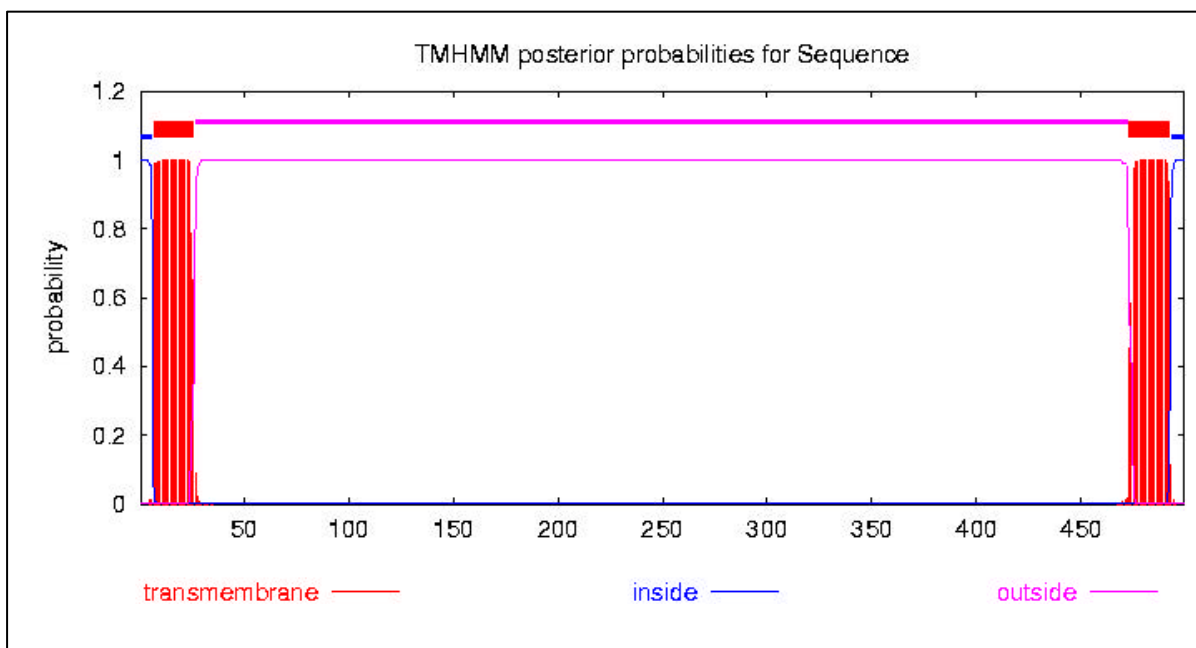


Abb. 18: Analyse der Proteinsegmente in der Primärsequenz von InlD<sup>1</sup>

Abb. 19: Analyse der Proteinsegmente in der Primärsequenz von InlF<sup>1</sup>

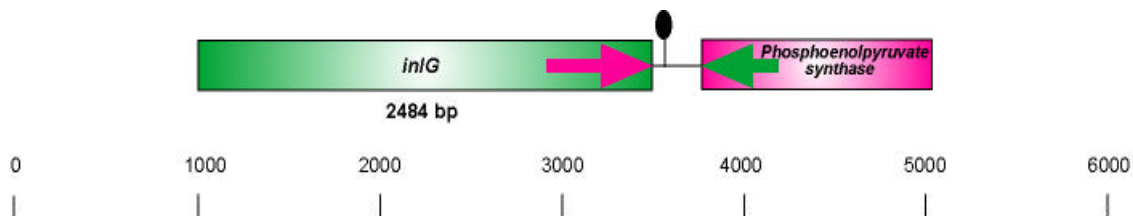


<sup>1</sup> Computerprogramm verfügbar unter: [www.cbs.dtu.dk/services/](http://www.cbs.dtu.dk/services/)



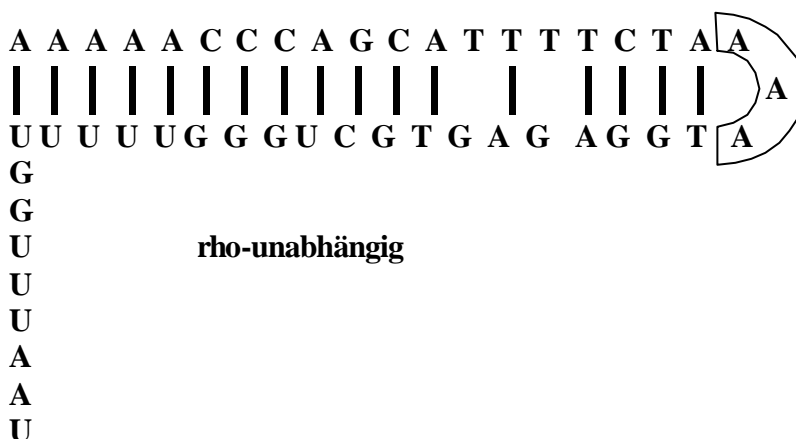
## 5.2 Klonierung und Sequenzierung des *inlG*-Genes

Aus einem *L. monocytogenes* Stamm, der ebenfalls als EGD bezeichnet wird, wurde ein weiteres Internalin, benannt als *inlF*, beschrieben (Dramsi et al., 1997). Da in den Arbeitsgruppen, die mit Listerien arbeiten, verschiedene EGD-Stämme kursieren, wurde überprüft, ob dieses Gen auch in dem EGD-e Stamm vorhanden ist, der in dieser Arbeit verwendet wurde. Es wurde daher mithilfe der beiden Oligonukleotide *inlG1* und *inlG2*, die in den kodierenden Randbereichen des Gens binden, eine spezifische PCR durchgeführt und das PCR Produkt kloniert und sequenziert. Das korrespondierende Gen des Stammes EGD-e erhielt die Bezeichnung *inlG*, in Anlehnung an die fortlaufende Nomenklatur für Internaline in der Arbeitsgruppe. Die Sequenzierungsergebnisse zeigten, dass *inlF* (Dramsi et al., 1997) und *inlG* (dieser Arbeit) zu 99,3 % identisch sind.



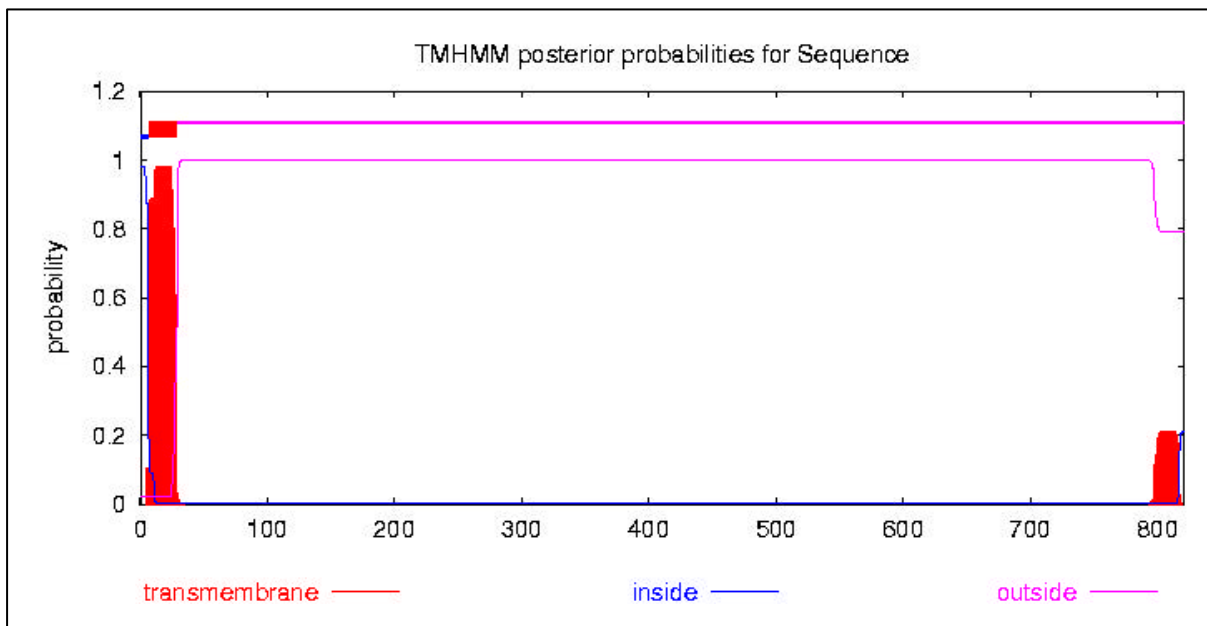
**Abb.20:** Schematische Darstellung des *inlG*-Genes von *Listeria monocytogenes* EGD-e  
 ● Terminator

**Abb. 21:** Sequenz des putativen Terminators (3096bp-3136bp, in gelb dargestellt im Anhang) der *inlG*-mRNA bei *L. monocytogenes* EGD-e



### Charakterisierung der Proteinsegmente in der Primärsequenz von InlG

**Abb. 22:** Analyse der Proteinsegmente in der Primärsequenz von InlG<sup>1</sup>



### 5.3 Homologieanalyse der Gene *inlF*, *inlD*, *inlE* und *inlG* und deren Genprodukte

Mittels Datenbankanalysen und der Hilfe des Computerprogramms BLASTP aus Husar 4.0 oder von GenBank wurde die Verwandtschaft der Genprodukte InlFDEG zu anderen Proteinen untersucht, um so auch Rückschlüsse auf deren Funktion ziehen zu können. Unter Eukaryontenproteinen konnte durch diese vergleichenden Analysen zum Beispiel Homologien zu den LRR des *sds22*-Genproduktes gefunden werden. Sds ist ein Regulator des Phosphatase 1-Proteins von *Saccharomyces pombe* (Ohkura et Yanagida, 1991). Da es sich bei den LRR-Proteinen von *L. monocytogenes* um eine sogenannte Multigenfamilie handelt, sollten die Homologien der Moleküle innerhalb dieser Familie untersucht werden. Es wurde daher ein "Alignment" mit Hilfe des Computerprogramms MegAlign aus DNASTAR mit den folgenden Internalinen aus *Listeria monocytogenes* EGD-e durchgeführt (EGD-e und EGD sind unterschiedliche *L. monocytogenes* Stämme!):

- InlA, InlB (Torsten Hain, 1999) aus EGD-e
- Internalin ähnlichen Protein IrpA (InlC) (Domann et al., 1997) aus EGD-e
- InlF, InlD, InlE und InlG (dieser Arbeit) aus EGD-e
- InlC2, InlD und InlE (Dramsi et al., 1997) aus EGD
- InlF (Dramsi et al., 1997) aus EGD

<sup>1</sup> Computerprogramm verfügbar unter: [www.cbs.dtu.dk/services/](http://www.cbs.dtu.dk/services/)

Diese Homologien werden als konservierte Bereiche bezeichnet und sind in der Homologie-Sequenz mittels einer **gelben** Farbe gekennzeichnet (siehe Anhang).

InlA	InlB	InlC (IrpA)	InlC2 Dramsi	InlD	InlD Dramsi	InlF	InlE	InlE Dramsi	InlG	
***	31.9	39.7	51.1	51.1	50.6	51.8	44.5	44.9	40.9	InlA
	***	38.4	33.2	33.4	30.7	33.5	32.9	33.5	27.6	InlB
		***	36.0	36.0	37.4	33.7	35.4	36.0	32.7	InlC (IrpA)
			***	97.1	62.0	54.5	61.3	61.9	44.5	InlC2-Dramsi
				***	64.1	53.7	61.7	62.3	45.3	InlD
					***	49.2	48.7	49.3	43.6	InlD-Dramsi
						***	39.8	40.0	44.1	InlF
							***	98.6	39.7	InlE
								***	39.9	InlE-Dramsi
									***	InlG
<b>Identität %</b>										

**Tab 5:** Homologievergleich der bekannten Internalin-Proteine aus *L. monocytogenes* Stämmen.

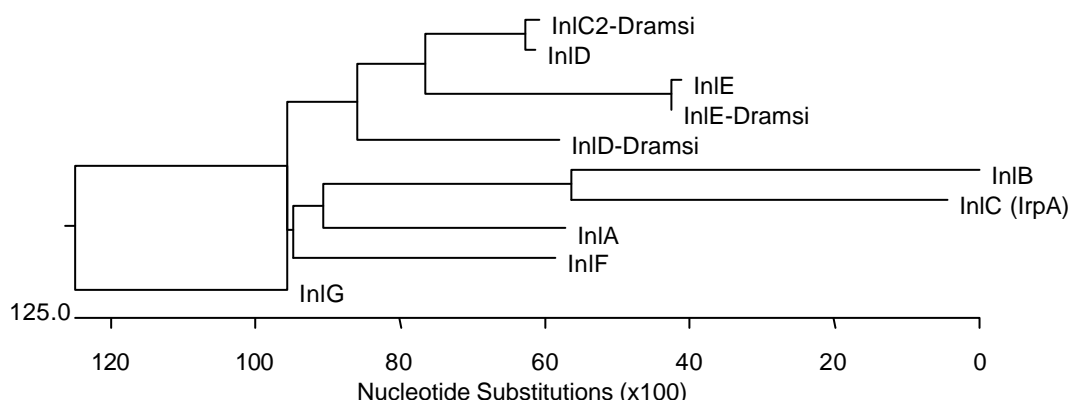
\*\*\* = 100% identisch

Inl-L. m EGD-e = Internalin aus *L. monocytogenes* EGD-e (dieser Arbeit)

Inl-L. m EGD (Dramsi) = InternalinX aus *L. monocytogenes* EGD (Arbeit von Dramsi et al., 1997)

#### 5.4 Phylogenetischer Baum der verschiedenen Internaline von *L. monocytogenes*

Mit Hilfe des Computerprogramms MegAlign des Software-Paketes Dnastar wurde ein phylogenetischer Baum der verschiedenen Internaline von *L. monocytogenes* hergestellt. Es konnte gezeigt werden, dass InlG dem „ursprünglichen Internalin“ am nächsten ist und dass die restlichen Proteine der Internalin-Familie davon abgezeigt sind und sich auch untereinander weiter verzweigt haben. InlB und InlC (IrpA) sind laut dieser Analyse offensichtlich die jüngsten Mitglieder dieser Familie. InlB gehört zu den wichtigsten Faktoren, die die Internalisation von *L. monocytogenes* in nicht phagozytierende Zellen vermittelt, da dieses Molekül das breiteste Wirtszellspektrum ermöglicht. Die Funktion von InlC (IrpA) ist bis jetzt unklar.



**Abb.23:** Phylogenetischer Baum der verschiedenen Internaline von *L. monocytogenes*

### 5.5 Darstellung der Internalin-Familie in *Listeria monocytogenes* EGD-e

Die primäre Aminosäuresequenz der neu gefundenen *inl*-Gene aus *L. monocytogenes* EGD-e wurde auf charakteristische Merkmale hin untersucht und zur besseren Erkennung graphisch dargestellt und mit den bekannten Internalinen InlA, InlB und IrpA/InlC verglichen. Charakteristische Merkmale sind: Signalpeptidsequenz, Spacer, LRR-Region, Spacer, Repeat-Region II, Zellwandanker.

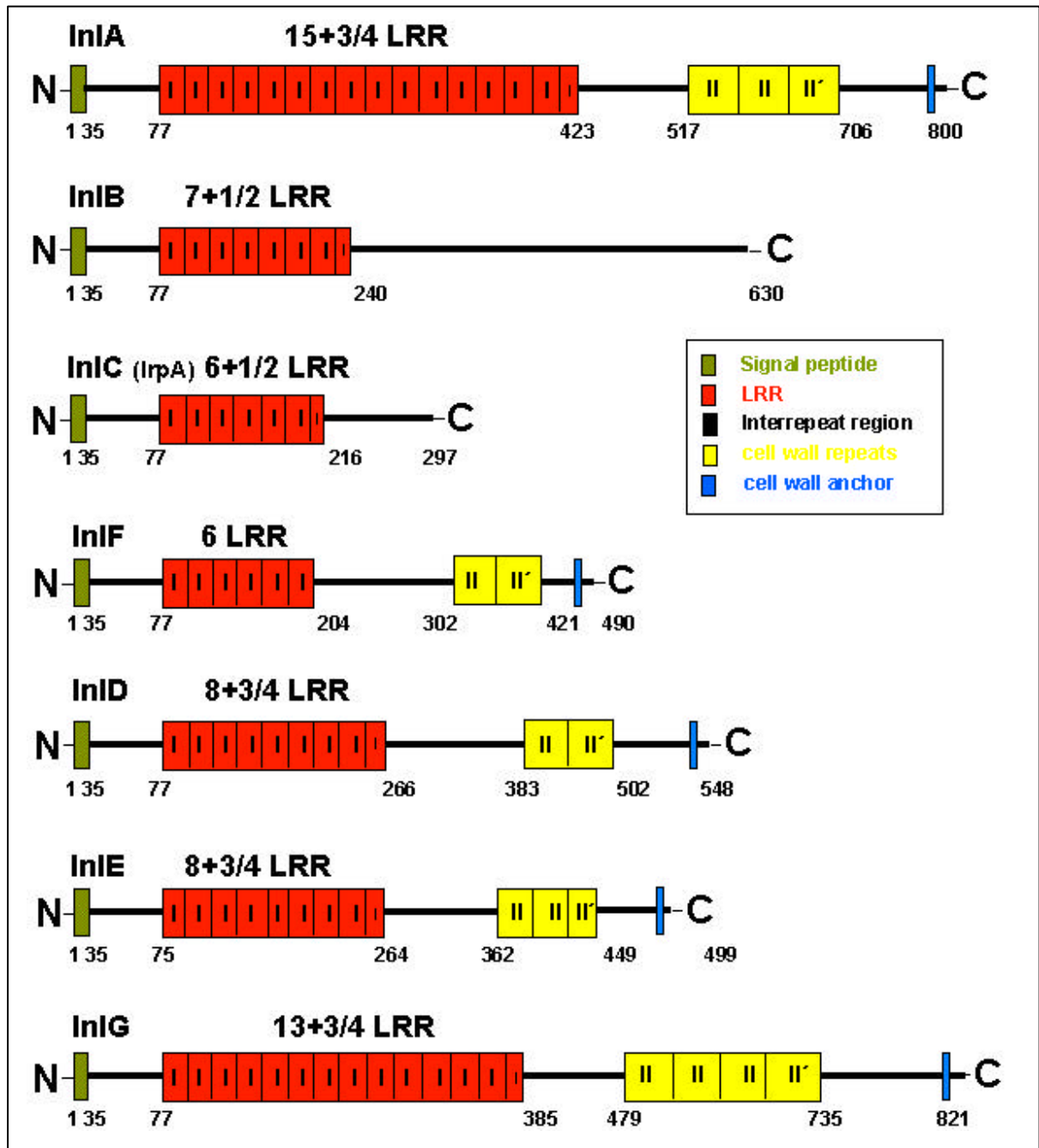


Abb.24: Schematische Darstellung der Proteine InlA, InlB, IrpA/InlC, InlF, InlD, InlE und InlG in *L. monocytogenes* EGD-e (Grundlage dieser Abbildung ist eine Sequenzanalyse: siehe Anhang).

Das *inlF*-Gen ist 1.470 bp groß und kodiert für ein Protein von 490 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 53.321 Da, welches aus zwei Repeat-Regionen (I, II) besteht. Die erste Region I ist zwischen der 77 As. und der 204 As. lokalisiert und besteht aus 6 aufeinanderfolgenden Leucin-reichen Repeats (LRR) von jeweils 22 Aminosäuren Länge. Die zweite Region II erstreckt sich von der 302 As. bis zur 421As. und besteht aus 2 Repeats von jeweils 71 bzw. 50 As.

InlF besitzt am N-Terminus eine Signalsequenz zum Transport des Proteins durch die Zellmembran und am C-Terminus einen putativen Zellwandanker mit dem Motiv LPKTS, gefolgt von einer Reihe von 22 hydrophoben Aminosäuren und endet mit einem Rest aus positiv geladenen As. Dieses Motiv unterscheidet sich von dem Prototypmotiv LPXTG nur durch den Austausch des Glycins mit einem Serin. Das InlF-Protein zeigt 47,8 % Ähnlichkeit zu InlA. Dennoch ist InlF viel kleiner als InlA (490As. vs. 800As.). Dieser Größenunterschied beruht hauptsächlich auf einer verkürzten Anzahl von 10 LRR-Einheiten in der ersten Region I und einem fehlenden Repeat von 70 As. in der Region II. Dieser Befund erlaubt die Hypothese, dass die Funktionen der verschiedenen Internaline durch die Anzahl der LRR und darin enthaltene Aminosäuresequenzunterschiede determiniert werden. Weitere Veränderungen, wie z. B. fehlende oder zusätzliche Abschnitte (s. Repeat II) tragen sicherlich ebenfalls dazu bei.

Das *inlD*-Gen ist 1.644 bp groß und kodiert für ein Protein von 548 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 58.680 Da, welches aus 8 $\frac{3}{4}$ LRR-Einheiten in der Region I und, wie InlF, aus zwei Repeats von 71 bzw. 71 As. in der Region II, besteht. Die erste Region I ist zwischen der 77 As. und der 266 As. lokalisiert und die zweite Region II erstreckt sich von der 383 As. bis zur 502 As. Das InlD-Protein ähnelt zu 98% InlC2 (Dramsi et al., 1997), sowohl an der As-Komposition als auch in der Gesamtgröße. Interessanterweise ist der C-Terminus dieses InlD (Dramsi, 1997) außer 2 As. (Reste 415 und 487) auch sehr identisch zum InlD-Protein (dieser Arbeit), obwohl die beiden InlD insgesamt nur zu 53,5 % identisch sind. Die drei Proteine InlC2, InlD (Dramsi) und InlD (diese Arbeit) verfügen über das gleiche Zellwandankermotiv, nämlich LPTAG.

## 5. ERGEBNISSE

Majority	M K K R W N S V F K L V L M V A A I L G I S L Y V T T S Q G V E V R A E S I T Q P T A I N V I F P D	
	10 20 30 40 50	
InlC2-Dramsi	M K K R W N S V F K L V L M V T A I I L G L S L Y V T T S Q G V E V R A E S I T Q P T A I N V I F P D	50
InlD-Dramsi	- M K R N K T A L R I L V T L A V V M A I S F W V G T S S - K E V Q A A E I G Q P T A I N V I F P D	48
InlD	M K K R W N S V F K L V L M V A A I L G I S L Y V T T S Q G V E V R A E S I T Q P T A I N V I F P D	50
Majority	P A L A N A I K I A A G K S N V T D T V T Q A D L D G I T T L S A F G T G V T T I E G V Q Y L N N L	
	60 70 80 90 100	
InlC2-Dramsi	P A L A N A I K I A A G K S N V T D T V T Q A D L D G I T T L S A F G T G V T T I E G V Q Y L N N L	100
InlD-Dramsi	E N L A N A I K T T L S K P S T A S A V S Q V E L D S V R D V T A E S S N I A S L E G V Q Y L N N L	98
InlD	P A L A N A I K I A A G K S N V T D T V T Q A D L D G I T T L S A F G T G V T T I E G V Q Y L N N L	100
Majority	I G L E L K D N Q I T D L T P L K N L T K I T E L E L S - - - - -	
	110 120 130 140 150	
InlC2-Dramsi	I G L E L K D N Q I T D L T P L K N L T K I T E L E L S - - - - -	128
InlD-Dramsi	D T L V L N N N K I T D L N P L A G L T K L S I L E A S N N Q L S D I S A L S N V T N L H Q L R L D	148
InlD	I G L E L K D N Q I T D L T P L K N L T K I T E L E L S - - - - -	128
Majority	G N P L K N V S A I A G L Q S I K T L D L T S T Q I T D V T P L A G L S N L Q V L Y L D L N Q I T N	
	160 170 180 190 200	
InlC2-Dramsi	G N P L K N V S A I A G L Q S I K T L D L T S T Q I T D V T P L A G L S N L Q V L Y L D L N Q I T N	178
InlD-Dramsi	G N Q I K Q L N G V S N L I N L E T I E L S N N Q I T A I S P V S G L K N L V G L G I D N N K I S D	198
InlD	G N P L K N V S A I A G L Q S I K T L D L T S T Q I T D V T P L A G L S N L Q V L Y L D L N Q I T N	178
Majority	I S P L A G L T N L Q Y L S I G N A Q V S D L T P L A N L S K L T T L K A D D N K I S D I S P L A S	
	210 220 230 240 250	
InlC2-Dramsi	I S P L A G L T N L Q Y L S I G N A Q V S D L T P L A N L S K L T T L K A D D N K I S D I S P L A S	228
InlD-Dramsi	L S P I S G L S K L N H L T A D S N Q I S D L R P L S N L A A M E V M R L D G N Q I S D V T P I A N	248
InlD	I S P L A G L T N L Q Y L S I G N A Q V S D L T P L A N L S K L T T L K A D D N K I S D I S P L A S	228
Majority	L P N L I E V H L K N N Q I S D V S - - - P L A N T S N L F I V T L T N Q T I T N Q P V F Y Q N N L	
	260 270 280 290 300	
InlC2-Dramsi	L P N L I E V H L K N N Q I S D V S - - - P L A N T S N L F I V T L T N Q T I T N Q P V F Y Q N N L	275
InlD-Dramsi	L A N L N Y V F L A E N Q I S D I S S L Q P L F N S P N F F G I T L D N Q K I T S E P V L Y Q Q E L	298
InlD	L P N L I E V H L K N N Q I S D V S - - - P L A N T S N L F I V T L T N Q T I T N Q P V F Y Q N N L	275
Majority	V V P N X V K G P S G A P I A P A T I S D N G T Y A S P N L T W N L T S F I N N V S Y T F N Q S V T	
	310 320 330 340 350	
InlC2-Dramsi	V V P N I V K G P S G A P I A P A T I S D N G T Y A S P N L T W N L T S F I N N V S Y T F N Q S V T	325
InlD-Dramsi	V V P N N I K D E M G A L I A P A T I S D N G V Y A S P N I N W N L P N Y T N Q V S Y T F N K Q L A	348
InlD	V V P N V V K G P S G A P I A P A T I S D N G T Y A S P N L T W N L T S F I N N V S Y T F N Q S V T	325
Majority	F K N T T V P F S G T V T Q P L T E A Y T A V F D V D G K Q T S V T V G A N E L I K E P T A P T K E	
	360 370 380 390 400	
InlC2-Dramsi	F K N T T V P F S G T V T Q P L T E A Y T A V F D V D G K Q T S V T V G A N E L I K E P T A P T K E	375
InlD-Dramsi	Y G - - - S F S G T V T Q P L H N A Y T A T F D V D G V K T N E A V E E T K L L Q E P I A P T K E	394
InlD	F K N T T V P F S G T V T Q P L T E A Y T A V F D V D G K Q T S V T V G A N E L I K E P T A P T K E	375
Majority	G Y T F T G W Y D A K T G G N K W D F A T D K M P A E D I T L Y A Q F T I N S Y T A T F D I D G K L	
	410 420 430 440 450	
InlC2-Dramsi	G Y T F T G W Y D A K T G G N K W D F G V D K M P A E N I T L Y A Q F T I N S Y T A S F D N D G K L	425
InlD-Dramsi	G Y T F T G W Y D A K T G G N K W D F A T D K M P A E D I T L Y A Q F T I N S Y T A T F D I D G K L	444
InlD	G Y T F T G W Y D A K T G G T K W D F A T D K M P A E D I T L Y A Q F T I N S Y T A T F D I D G K L	425
Majority	T T Q K V T Y Q S L L E E P V A P T K D G Y T F T G W Y D A K T G G T K W D F A T G K M P A G N I T	
	460 470 480 490 500	
InlC2-Dramsi	T T Q K V T Y Q S L L E E P A A P T K T G Y T F K G W Y D A K T G G T K W D F A T G K M P A G N I T	475
InlD-Dramsi	T T Q K V T Y Q S L L E E P V A P T K D G Y T F T G W Y D A K T G G T K W D F A T G K M P A G N I T	494
InlD	T T Q K V T Y Q S L L E E P V A P T K D G Y T F T G W Y D A K T G G T K W D F A T G K M P A G N I T	475
Majority	L Y A Q F T K N D N P N P D D P T T N T P T G N G D G T S N P S N S G G N T T L P T A G D E N T M L	
	510 520 530 540 550	
InlC2-Dramsi	L Y A Q F T K N D S P N P N D P T P N T P T G N G D G T S N P S N S G G N T T L P T A G D E N T M L	525
InlD-Dramsi	L Y A Q F T K N D N P N P D D P T T N T P T G N G D G T S N P S N S G G N T T L P T A G D E N T M L	544
InlD	L Y A Q F T K N D N P N P D D P T T N T P T G N G D G T S N P S N S G G N T T L P T A G D E N T M L	525
Majority	P I F I G V F L L G T A T L I L R K T I K V K	
	560 570	
InlC2-Dramsi	P I F I G V F L L G T A T L I L R K T I K V K	548
InlD-Dramsi	P I F I G V F L L G T A T L I L R K T I K V K	567
InlD	P I F I G V F L L G T A T L I L R K T I K V K	548

**Abb.25:** Homologieanalyse (Clustal) der Internaline: InlC2 (Dramsi et al., 1997), InlD (dieser Arbeit) und InlD (Dramsi, 1997) mit Hilfe des Programms MegAlign/DNASTAR.

Das in dieser Arbeit charakterisierte *inlE*-Gen ist zu 98% identisch zum *inlE* Gen in der Arbeit von Dramsi et al. (1997). Die zwei Gene unterscheiden sich untereinander nur in 7 As., nämlich E durch G (Position 44), I durch N (Position 45), K durch T (Position 115), T durch A (Position 210), A durch V (Position 329), I durch N (Position 440) und E durch K (Position 472). Das InlE-Protein besteht aus 499As. mit einem Molekulargewicht von 53.940 Da und besitzt in der I-Region 8 $\frac{3}{4}$ LRR-Einheiten (As. 75-264) und in der Repeat II Region zwei Repeats (As. 362-449). InlE ist wahrscheinlich ebenfalls in der Zellwand durch das LPITG-Motiv verankert.

Das *inlG*-Gen ist identisch zu InlF (Dramsi et al., 1997), ist 2.466 bp groß und kodiert für ein Protein von 821 As. mit einem Molekulargewicht von 90.553 Da. Das Molekül besteht auch aus zwei Repeat-Regionen (I, II). Die erste Region I ist zwischen der 77 As. und der 385 As. lokalisiert und besteht aus 13 $\frac{3}{4}$  aufeinanderfolgenden Leucin-reichen Repeats (LRR) von jeweils 22 Aminosäuren. Die zweite Region II erstreckt sich von der 479 As. bis zur 735 As. und besteht aus 4 Repeats. InlG besitzt am C-Terminus einen putativen Zellwandanker, ähnlich zu dem Motiv von InlA mit LPKTG, gefolgt von einer Reihe von hydrophoben Aminosäuren sowie von einem Schwanz aus positiven geladenen Resten. Dieses Motiv stimmt mit dem Prototyp-Motiv LPXTG überein. Das ableitende InlG-Protein zeigt 40,1 % Ähnlichkeit zu InlA.

Durch die im **Anhang** dargestellten Ergebnisse der durchgeführten Homologieanalyse der verschiedenen Internaline ist folgendes festzustellen:

- Alle diese Internaline verfügen im N-Terminus über ein spezifisches bakterielles Signalpeptid von 35 As (Pugsley, 1990)
- Die Zahl der LRR-Einheiten schwankt erheblich zwischen 5 und 15 in der Repeat-Region I und zwischen 2 und 4 in der Repeat-Region II.
- Die Interrepeatregionen sind hoch konserviert (siehe 5.3)
- Die isoelektrischen Punkte (pI) liegen mit Ausnahme von IrpA/InlC(6.4) und InlB(9.8) sehr dicht beieinander: InlF(4.7), InlD(4.6), InlE(4.7) und InlG(4.5)
- Mit Ausnahme von InlB und IrpA/InlC verfügen alle anderen Internaline am C-Terminus über 29 hydrophobische As (InlG nur 26), denen ein pentapeptisches LPXTG-Motiv und ein kurzer positiv geladener As-Schwanz folgt.

Diese C-terminale Region dient als Motiv für die Verankerung grampositiver Oberflächen-Proteine, wie es z.B. im Fall von Protein A von *Staphylococcus aureus* beschrieben wurde (Schneewind et al., 1995). Protein A ist im Peptidoglykan über eine kovalente Verbindung zwischen dem carboxylischen Ende des Threoninrestes des LPXTG-Motivs und der freien

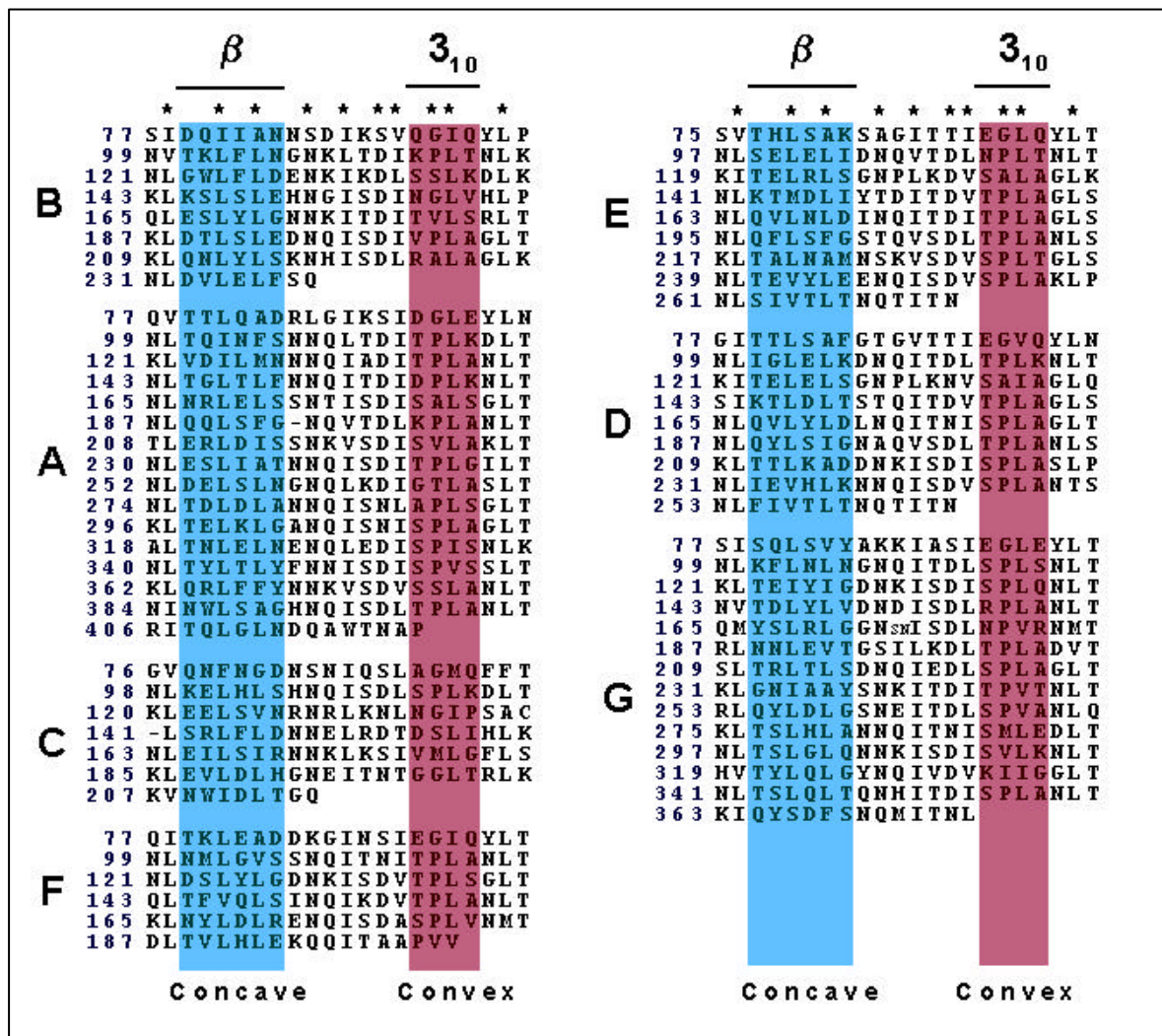


Aminogruppe des Peptidoglykans gebunden (Schneewind et al., 1993). Bei InlD konnte in Position 4 des LPXTG-Motivs ein Aminosäureaustausch (Alanin statt Threonin) gefunden werden, was sich möglicherweise auf die Verankerung des Moleküls in der Zellwand auswirken könnte

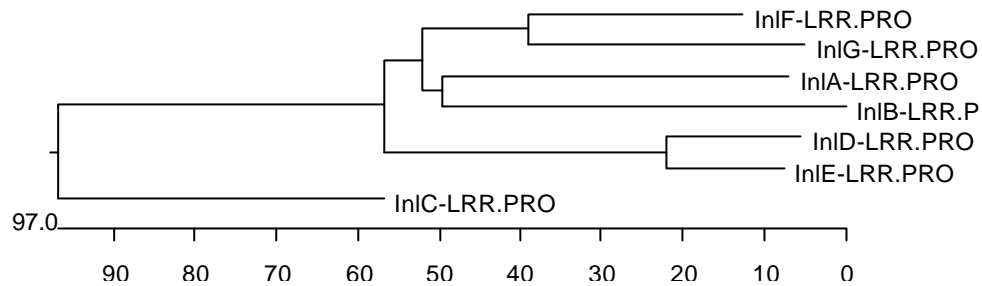
**Abb.26:** Sequenzalignment der Leucin reichen Repeats der Internaline A-, B-, C-(IrpA), D-, E- und G von *L. monocytogenes* EGD-e (Serotyp 1/2a) auf der Basis der Kristallstruktur von InlB (Marino, 2000).

\* = Konservierte LRR-Reste; Schwarze Linien =  $\beta$ -Faltblatt und  $3_{10}$ -Helix basierend auf der InlB-Struktur.  = Reste bilden die Concave-Seite;  = Reste bilden die Convexe -Seite.

Alle LRR sind 22 As. lang, mit Ausnahme von Repeat Nr. 4 von IrpA/InlC, Repeat Nr. 6 von InlA und Repeat Nr. 5 von InlF







**Abb.27:** Schematische Darstellung des phylogenetischen Baums der LRR innerhalb *L. monocytogenes* EGD-e (Serotyp 1/2a)

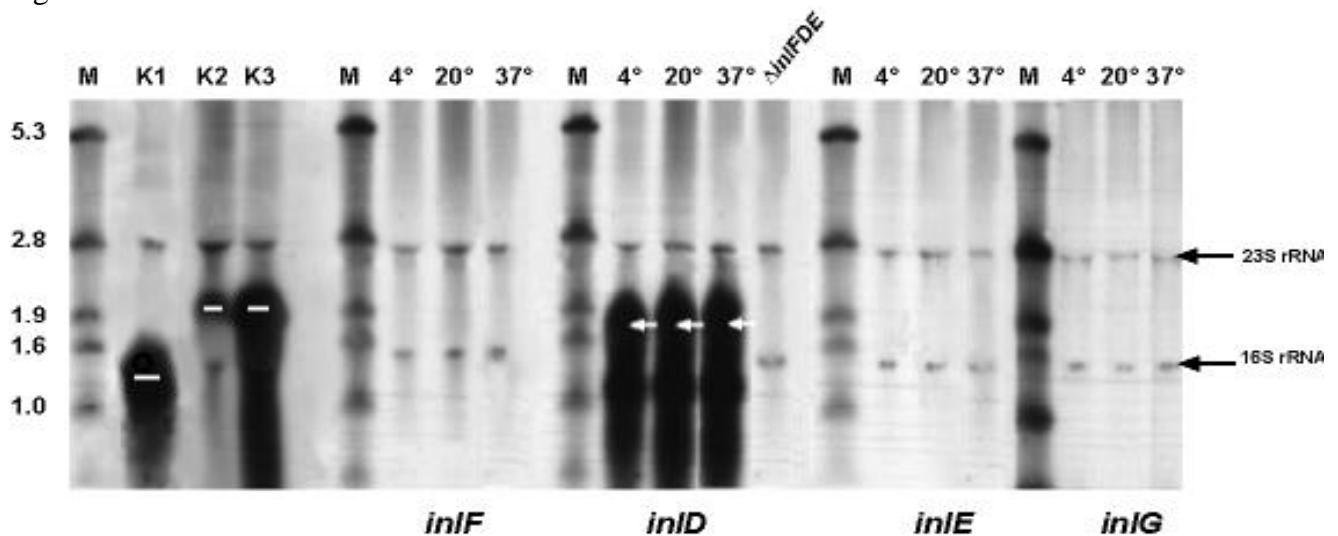
<u>InIA</u>	<u>InIB</u>	<u>InIC</u>	<u>InIF</u>	<u>InID</u>	<u>InIE</u>	<u>InIG</u>	
***	29.6	17.5	28.4	28.5	27.5	37.7	<u>InIA</u>
	***	54.2	48.3	54.5	54.9	31.4	<u>InIB</u>
		***	55.2	48.8	49.1	22.8	<u>InIC</u>
			***	40.5	41.4	36.2	<u>InIF</u>
	<b>Identität %</b>			***	85.3	22.6	<u>InID</u>
					***	23.4	<u>InIE</u>
						***	<u>InIG</u>

**Tab 6:** Homologievergleich der Leucin-reichen Repeats (LRR) von *L. monocytogenes* EGD-e (Sereotyp 1/2a). (\*\*\* = 100% identisch ).

### 5.6 Nachweis der *inlF*-, *D*-, *E*- und *G*-Transkripte durch RNA-DNA-Hybridisierung (Northern Blot)

Zum Nachweis der *inl*-Transkripte wurden RNA-DNA-Hybridisierungsstudien durchgeführt. 5 µg Gesamt-RNA wurden dazu auf einem Formaldehydgel aufgetrennt. Die Analyse erfolgte durch Northern Blot und Hybridisierung mit Sonden gegen die einzelnen *inl*-Gene. Die Analyse der Transkripte der *inlF*-, *D*-, *E*- und *G*-Gene im Northern Blot zeigte unter den angewandten Anzuchtbedingungen nur ein einziges Transkript für *inlD*. Weder für *inlF*, *E* noch *G* konnte ein Transkript detektiert werden. Die erhaltene Länge des *InlD*-Transkriptes stimmt mit der kalkulierten Transkriptlänge von mindestens 1647 Nukleotiden überein, wenn ein monocistronisches Transkript vorausgesetzt wird. Dieses Ergebnis ist Temperatur-unabhängig und das monocistronische Transkript wird sowohl bei einer Anzuchttemperatur von 4°C und 20°C, als auch bei 37°C gefunden. Eine schwache Hybridisierung der verwendeten Sonden mit der rRNA konnte bei den Transkriptionsstudien nicht verhindert werden. Die fehlenden Transkripte, d. h., keine Expression, von *inlF*, *E*, und *G* könnten auf

verschiedene Ursachen zurückzuführen sein: O<sub>2</sub>-Gehalt, pH-Wert, Metallionen (z. B. Eisengehalt) oder bakterielle und/oder eukaryontische Regulationsfaktoren oder Signalmoleküle.



**Abb. 28:** Ergebnisse der RNA-Hybridisierung der Transkripte *inlF*, *D*, *E* und *G* bei 4°C, 20°C und 37°C mit Dig markierten DNA-Sonden. Die Pfeile zeigen die erhaltenen Transkripte von *inlD*. **M:** RNA-Marker; **K1:** Flagellin als positive Kontrolle bei 4°C; **K2:** Hämolyysin als positive Kontrolle bei 20°C; **K3:** Hämolyysin als positive Kontrolle bei 37°C

**Anmerkung:** Die Deletionsmutante  $\Delta inlFDE$  wurde als Negativkontrolle eingesetzt, um die Spezifität der eingesetzten Sonden zu zeigen.

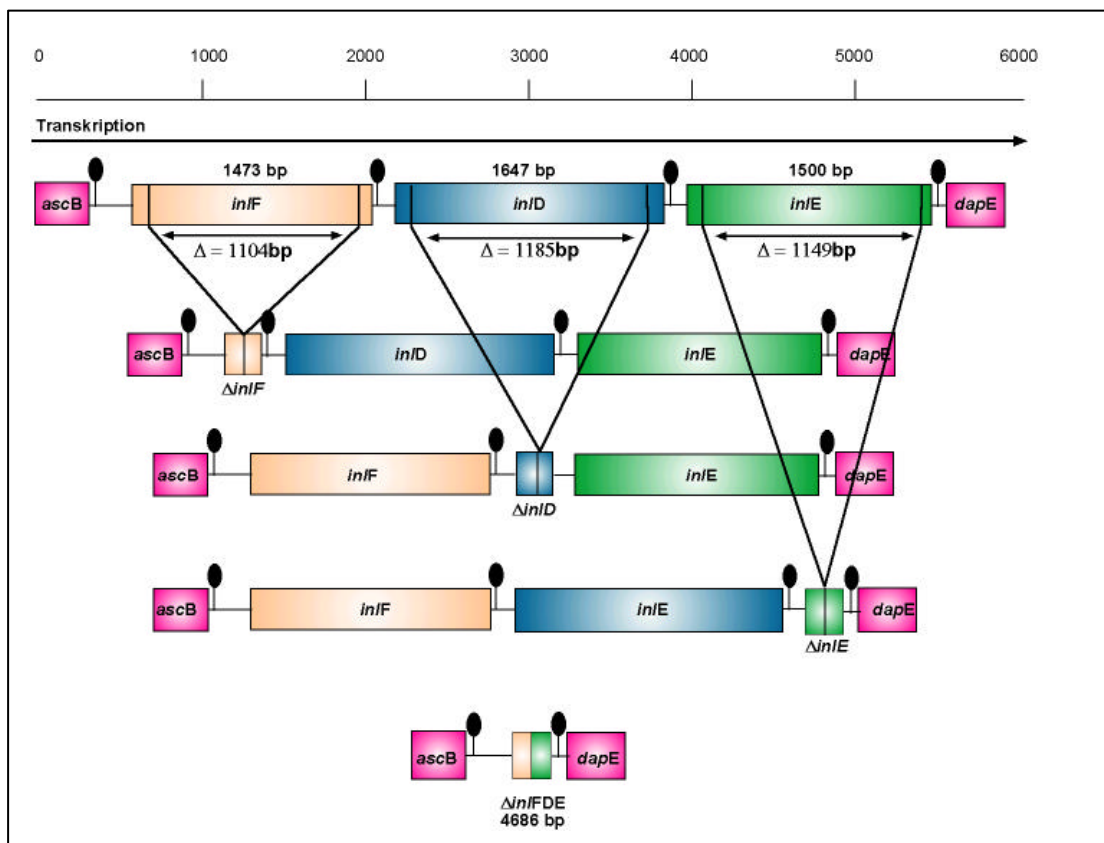
### 5.7 Herstellung chromosomaler “in frame” Deletionsmutanten im *inlFDE*-Locus

Zur Herstellung von Deletionsmutanten im *inlFDE*-locus wurden in PCR-Reaktionen zwei DNA-Fragmente so amplifiziert, dass die zusammengesetzten PCR-Produkte eine Deletion “in frame” von ca. **80%** des Gens beinhalten. Die genaue Beschreibung des Verfahrens zur Herstellung von Listerien Deletionsmutanten ist unter 4.19 beschrieben.

In der folgenden Tabelle (Tab. 7) sind alle hergestellten Deletionsmutanten im *inlFDE*-Locus dargestellt.

**Tab. 7:** Isogene, chromosomale Deletionsmutanten im *inlFDE*-Locus

Bezeichnung der Deletion	Angewandte Primer	Bezeichnung des rekombinanten Plasmiden	Größe der Deletion
$\Delta inlF$ in EGD-e	inlde bglIII1 und inlF NotIB inlF NotIA und inlF bglII	aus pCRII = pAD22 aus pAULA = pAD26	1104 bp
$\Delta inlD$ in EGD-e	inlD bglIIIA und inlD NotIB inlD NotIA und inlD bglIIB	aus pCRII = pAD23 aus pAULA = pAD27	1185 bp
$\Delta inlE$ in EGD-e	inlE bglIIIA und inlE NotIB inlE NotIA und inlde bglII2	aus pCRII = pAD24 aus pAULA = pAD28	1149 bp
$\Delta inlFDE$ in EGD-e	inlde bglIII1 und inlE NotIB inlF NotIA und inlde bglII2	aus pCRII = pAD21 aus pAULA = pAD25	4686 bp
$\Delta inlFDE$ in $\Delta inlAB$	inlde bglIII1 und inlE NotIB inlF NotIA und inlde bglII2	aus pCRII = pAD21 aus pAULA = pAD25	4686 bp

**Abb.29:** Darstellung der Konstruktion der verschiedenen Deletionsmutanten im *inlFDE*-Locus.  
Δ = Deletion

Die verschiedenen Mutationen wurden mittels PCR und Sequenzierung überprüft und bestätigt (Daten nicht gezeigt).

## 5.8 Infektionsversuche und Immunfluoreszenzfärbungen mit Listerien-Stämmen

### 5.8.1 Zellinfektion

Um festzustellen, ob die drei Internaline F, D und E am Infektionszyklus bzw. an der Internalisierung von Wirtszellen beteiligt sind, wurden Infektionsversuche am Zellinfektionsmodell durchgeführt. Die Infektionsversuche wurden mit den Stämmen EGD-e Wildtyp,  $\Delta inlF$ ,  $\Delta inlD$ ,  $\Delta inlE$ ,  $\Delta inlFDE$  und  $\Delta inlAB2$  durchgeführt. Alle Kulturen befanden sich zum Zeitpunkt der Infektion in der logarithmischen Wachstumsphase ( $OD_{600nm}$  ca. 0.8). Jeder Stamm wurde bei 37°C auf Infektionsfähigkeit getestet. Infiziert wurden Caco-2 und HeLa-Zellen.

Die Analyse der Infektion der *inlF*, D, E und *inlFDE*-Deletionsmutanten in Caco-2- und HeLa-Zellen ergab keinen Unterschied zur Infektion mit dem Wildtypstamm. Die *inlF*, D, E und *inlFDE*-Deletionsmutanten verhielten sich im Invasionsassay wie der Wildtyp EGD-e. Diese Ergebnisse wurden von einer anderen Arbeitsgruppe bestätigt, von der aber nur die Caco-2-Zelllinie getestet wurde (Raffelsbauer et al., 1998).

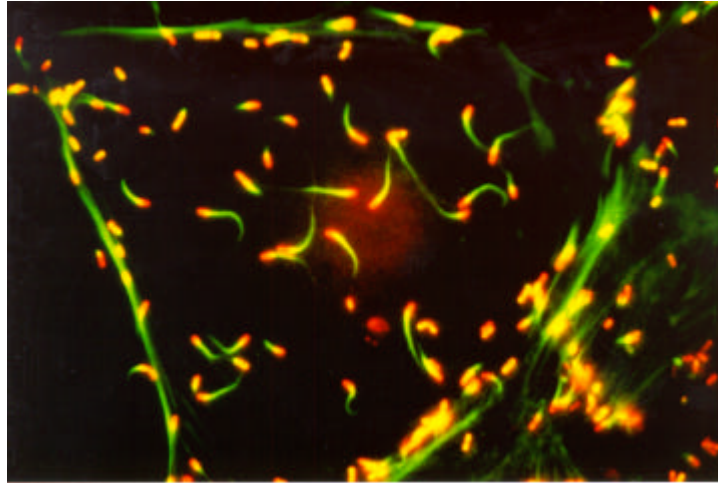
Zelllinie	Caco-2	HeLa
Stamm	Relative Invasion (%) $\pm$ Std. Abweichung	Relative Invasion (%) $\pm$ Std. Abweichung
EGD-e	100	100
<b><i>DinlAB</i></b>	$2.6 \pm 2.428$	$0.42 \pm 0.024$
<b><i>DinlF</i></b>	$106.61 \pm 40.73$	$132.34 \pm 17.05$
<b><i>DinlD</i></b>	$94.04 \pm 20.73$	$107.58 \pm 1.46$
<b><i>DinlE</i></b>	$89.43 \pm 29.24$	$82.95 \pm 8.93$
<b><i>DinlFDE</i></b>	$112.54 \pm 22.615$	$80.56 \pm 2.83$

Tab. 8: Invasionsverhalten der Internalin-Deletionsmutanten mit Caco-2- und HeLa-Zellen

### 5.8.2 Immunfluoreszenzfärbung

Die Immunfluoreszenzfärbungen infizierter Caco-2 und HeLa Zellen mit den Deletionsmutanten *inlF*, D, E und FDE in Caco-2- und HeLa-Zellen wurde wie unter 4.30 beschrieben durchgeführt.

Die Deletionsmutanten waren, wie oben gezeigt, wie der Wildtyp in der Lage, in die Wirtszellen einzudringen. Es konnte auch kein Unterschied im intrazellulären Verhalten gefunden werden. D. h., die Mutanten konnten sich aus dem Phagolysosom befreien, im Cytoplasma Aktin akkumulieren und Aktinschweife bilden, waren intrazellulär motil und infizierten ebenfalls benachbarte Wirtszellen.



**Abb.30:** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme

### 5.8.3 Mausinfektion

Die Mausinfektionen wurden von Herrn Dr. Ayub Darji (GBF, Braunschweig) durchgeführt. Dazu wurden die Stämme  $\Delta inlF$ ,  $\Delta inlD$ ,  $\Delta inlE$ ,  $\Delta inlFDE$  und der Wildtyp EGD-e in BHI-Medium bei 37°C angezüchtet und  $6 \times 10^3$  Bakterien intravenös in die Schwanzvene der Mäuse (Balb/c) injiziert. Hierzu wurden drei Mäuse pro Gruppe verwendet. Drei Tage später wurden die Mäuse geopfert und die Zahl der Bakterien in Leber und Milz aus jeder Maus bestimmt.

Interessanterweise konnte nur bei der  $\Delta inlD$ -Deletionsmutante bzw. bei der  $\Delta inlFDE$ -Deletionsmutante ein signifikanter Unterschied zum Wildtyp in Leber und Milz beobachtet werden. Somit konnte gezeigt werden, dass InlD offensichtlich ein Molekül ist, das *in vivo* wirkt und zum Überleben der eingedrungenen Bakterien beiträgt. Dies bedeutet, dass InlD in der Tat ein Pathogenitätsfaktor von *L. monocytogenes* EGD-e ist, was in dieser Arbeit zum erst mal gezeigt werden konnte und nicht aus den *in vitro* Zellkulturversuchen abzulesen war.

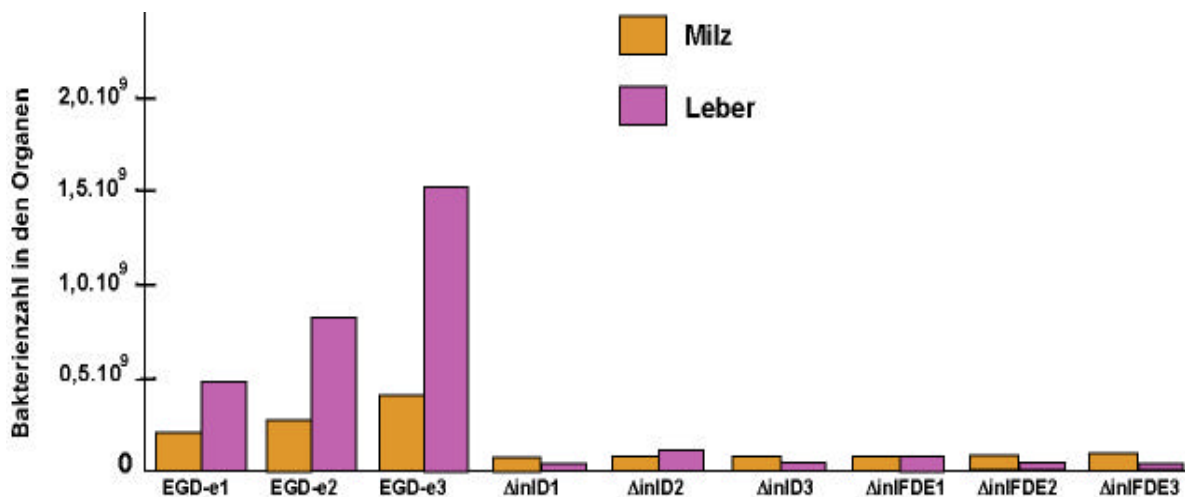


Abb. 31: Infektion von Mäusen mit 6000 Bakterien von *L. monocytogenes*-Stämmen (Mäuse geopfert am dritten Tag)

### 5.9 Promotoraktivitätsnachweis von *inlF*, *D*, *E* und *G* in *L. monocytogenes* EGD-e

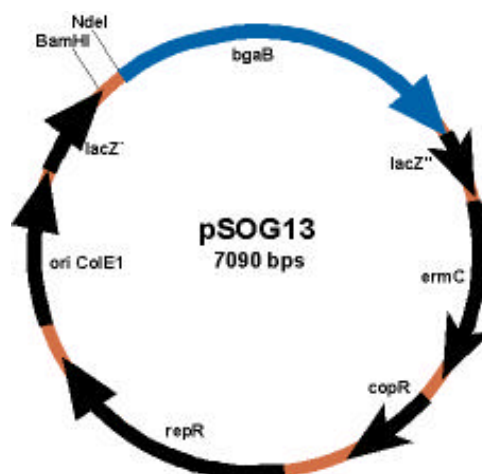
Um die Daten des Northern Blots bzw. des Infektionsversuchs zu bestätigen wurde eine Promotoraktivitätsstudie der verschiedenen Internalin-Gene durchgeführt. Dafür wurde ein Schaukel-Vektor mit der Bezeichnung pSOG13 (Sonia Otten, Inst. Med. Mikrobiologie, Giessen) benutzt. Es handelt sich um einen speziell für Transkriptionsstudien hergestellten Vektor mit einem Reportergen ( $\beta$ -Galaktosidase) aus *Bacillus stearothermophilus*. Der pSOG13-Vektor ist im Anhang dargestellt. Nach der Klonierung der zu untersuchenden DNA-Fragmente aus dem Promotorbereich und anschließender Transformation der rekombinanten Plasmide in *L. monocytogenes* EGD-e Wildtyp sollte bei Vorhandensein eines aktiven Promotors  $\beta$ -Galaktosidase nachzuweisen sein.

#### 5.9.1 Klonierung der putativen regulatorischen Regionen der *inlF*, *inlD*, *inlE* und *inlG*

Zur Amplifizierung der putativen Promotoren-Regionen von *inlF*, *inlD*, *inlE* und *inlG* wurden PCR mit spezifischen Oligonukleotidpaaren (siehe Tabelle 9) durchgeführt. Die PCR-Produkte wurden mittels BamHI/NdeI vor das *bgaB* Gen in den linearisierten Vektor pSOG13 eingebaut, so dass eine gerichtete Klonierung möglich war.

Promotor	Oligonukleotidbezeichnung	Größe
<i>inlF</i>	adF-BamHI & adF-NdeI	369 bp
<i>inlD</i>	adD-BamHI & adD-NdeI	448 bp
<i>inlE</i>	adE-BamHI & adE-NdeI	372 bp
<i>inlG</i>	adG-BamHI & adG-NdeI	641 bp
<i>bglA</i>	adbgl-BamHI & adbgl-NdeI	550 bp
<i>hly</i>	siehe Arbeit von Sonia Otten (Inst. Med. Mikrobiologie, Giessen)	

**Tab. 9:** Klonierung der verschiedenen Promotoren in das Plasmid pSOG13



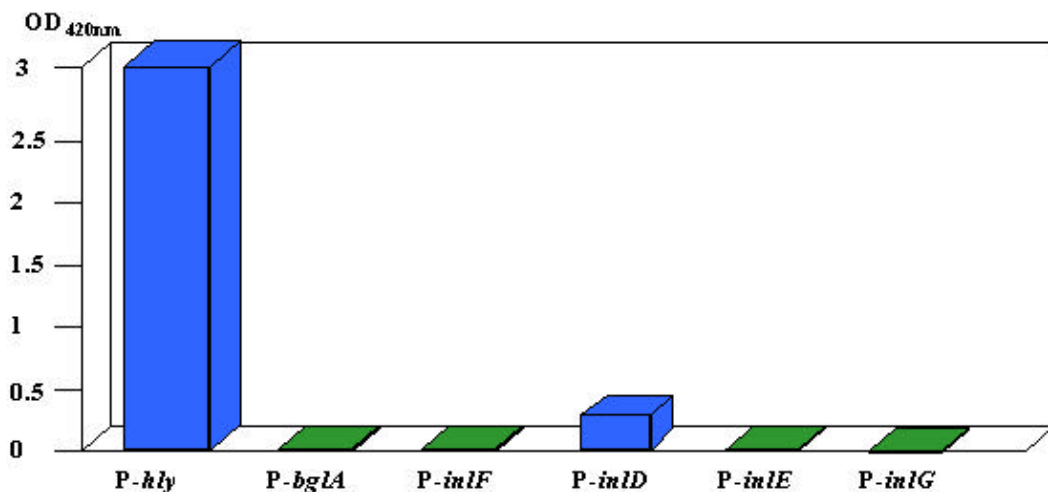
**Abb. 32:** Schematische Darstellung des pSOG13-Plasmides

### 5.9.2 Nachweis einer Beta-Galactosidase-Aktivität aus *Listerien*

In diesem Versuch sollte die Aktivität der putativen Promotoren von *inlF*, *inlD*, *inlE* und *inlG* in einem Reportersystem festgestellt werden, wofür der Promotor des Hämolyisins (*hly*) (siehe Einleitung) als positive Kontrolle und der stumme Promotor des  $\beta$ -Glukosidase-Gens (*bglA*) von *L. monocytogenes* EGD-e (Darbouche, 1996) als negative Kontrolle verwendet wurde. Die Aktivitätsmessung erfolgte nach Lyse der rekombinanten *L. monocytogenes*-Zellen mit Hilfe eines Phagenlysins nach der Methode von Dr. Martin Loessner (siehe 4.28; Loessner et al. 1995b) durch standardisierte Hydrolyse eines Galaktosidase-spezifischen Substrates, das nach Spaltung einen gelben Farbumschlag aufweist. Es handelt sich um das farblose o-Nitrophenyl- $\beta$ -D-glycopyranosid, dessen Hydrolyseprodukt o-Nitrophenol gelb ist. Die genaue Beschreibung der Methode ist unter 4.28 dargestellt.

Der Erfolg dieses Versuches lag im wesentlichen an der Art und Weise, wie die *Listerien* angezüchtet wurden. So konnte eine Promotoraktivität von *inlD* nur dann nachgewiesen werden, wenn der Stamm unter mikroaerophilen Bedingungen (Kulturröhrchen dicht verschlossen) angezüchtet wurde. Offensichtlich wirkt sich Sauerstoff inhibitorisch auf die Promotoraktivität aus.

**Abb. 33:** Graphische Darstellung der Promotoraktivität von *inlF*, *inlD*, *inlE* und *inlG*, gemessen bei einer optischen Dichte von 420 nm.  
Als positive Kontrolle (*hly*-Promotor) und als negative Kontrolle (*bglA*-Promotor).



Die hier gewonnenen Daten korrelieren sehr gut mit den Daten, die aus den Northern-Blots und den Mausinfektionsversuchen gewonnen wurden. Das *inlD*-Gen ist das einzige Gen aus diesem chromosomalen Abschnitt, das Transkription und Aktivität zeigt. Die Gene *inlF*, E und G scheinen unter den in dieser Arbeit getesteten Bedingungen nicht abgelesen zu werden.



### 5.10 Reinigung von InlF, D und E mit Hilfe eines *in vitro* Proteinexpressionssystems

Um eine ausreichende Menge von hoher Reinheit der Proteine InlF, D und E zu gewinnen, wurden die korrespondierenden Gene ohne Signal-Peptide in den Expressionsvektor **pGEX** kloniert.

#### 5.10.1 Klonierung von Internaline (ohne Signal-Peptid) in den Vektor pGEX

Die Voraussetzung für die Herstellung rekombinanter Inl-Proteine ohne Signal-Peptide war die Fusion mit Glutathion-S-Transferase (GST) im Expressionsvektor pGEX. Mittels PCR und spezifischer Oligonukleotide (siehe Tabelle) wurden die 3 verschiedenen *inl*-Gene ohne Signal-Peptide aus chromosomaler DNA amplifiziert. Die PCR-Produkte besaßen die kalkulierten Größen (siehe Tabelle), wobei durch den Restriktionsverdau mit BglII/MunI ihre Enden verändert worden waren, damit eine Klonierung in den mit EcoRI/BamHI geschnittenen pGEX-Expressionsvektor möglich war, d. h. der Leserahmen durch die Insertion unbeeinflusst blieb. Die Transformation erfolgte in kompetente *E. coli* BL21-Zellen (siehe Tabelle).

Internalinprotein (ohne S. Peptide)	Oligonukleotidbezeichnung	Vektor	Insert- Größe
InlF	GST Bgl II F2 & GST MunI F	pGEX-6P1	1739 bp
InlD	GST Bgl II D2 & GST MunI D	pGEX-6P1	1854 bp
InlE	GST Bgl II E2 & GST MunI E	pGEX-6P1	2192 bp

#### Das Plasmid pGEX-2TK zeichnet sich durch folgende Merkmale aus:

- einen *tac*-Promotor
- eine *lacI* <sup>q</sup> -Gen, verwendbar in jedem *E. coli*-Stamm
- Sehr milde Elutionsbedingungen für die Freigabe des Fusionsproteins aus dem Matrix
- einen sogenannten Glutathione S-Transferase (GST)-Tag zwischen der pGEX-Sequenz und der Polylinkerregion (ermöglicht die Aufreinigung des rekombinanten Proteins über eine Bindung des GST an Sepharose 4B)
- eine Enterokinase-Erkennungsstelle („PreScission Protease“ für pGEX-6P1 zur Abspaltung des nativen rekombinanten Proteins)
- eine Polylinkerregion (MCS = multiple cloning site)
- Als PCR-Universal- und Reversprimer für die Sequenzierung wurden 5'pGEX und 3'pGEX ausgewählt.

### 5.10.2 Expression der klonierten *inl*-Genprodukte

Die klonierten *inl*-Gene ohne Signal-Peptide wurden durch die Zugabe von IPTG exprimiert. Die Induktionsreaktionen wurden mit den in *E. coli* BL21 enthaltenen Plasmiden pADX (allgemein Begriff) und pGEX durchgeführt (siehe Kapitel 4.26). Nach 3 h Induktion waren die verschiedenen Internaline ohne Signal-Peptide im Coomassie gefärbten SDS-Gel deutlich sichtbar. Negativ war der Stamm mit dem Klonierungsvektor alleine ohne inseriertes *inl*-Gen.

### 5.10.3 Aufreinigung der GST-Internalin-Fusionsproteine

Aufgrund der erfolgreichen Protein-Expression konnte eine Aufreinigung der rekombinanten Proteine wie unter 4.26 beschrieben, durchgeführt werden. Die gereinigten Proteine wurden mittels einer SDS-PAGE überprüft (Abb. 35).

**Abb. 34:**

Coomassie gefärbtes SDS-Gel eines Gesamtproteinextraktes der klonierten *inl*-Gene ohne Signalpeptide in *E. coli* BL21

M: 10 kDa Marker

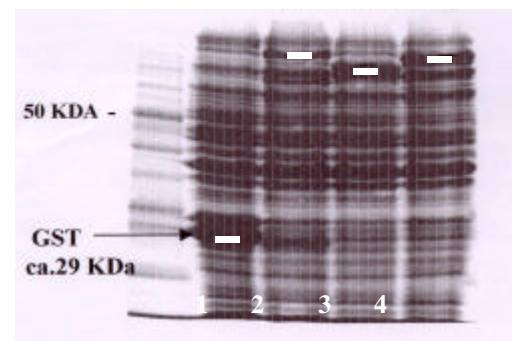
1: Negativ Kontroll (pGEX-6P1)

2: InlF (ohne S.Peptid) + GST: MW= 51.132 kDa + 29 kDa (GST) = 80.132 kDa

3: InlD (ohne S.Peptid) + GST: MW= 54.759 kDa+ 29 kDa (GST) = 83.759 kDa

4: InlE (ohne S.Peptid) + GST: MW= 51.847 kDa + 29 kDa (GST) = 80.847 kDa

Die Fusionsproteine sind durch weiße Striche gekennzeichnet



**Abb. 35:**

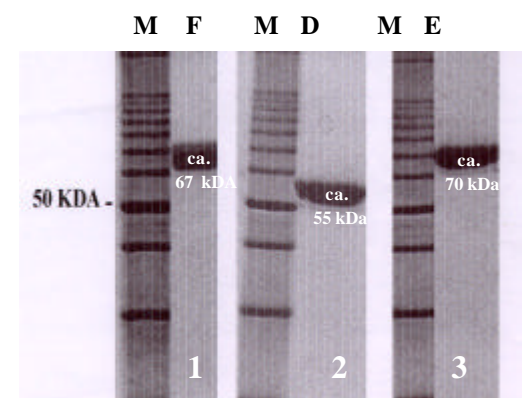
Coomassie gefärbtes SDS-Gel der gereinigten Proteine **InlF**, **InlD** und **InlE**.

M: 10 kDa Marker

1: Aufgereinigtes Protein InlF (ohne S.Peptid): MW= 51.132 kDa

2: Aufgereinigtes Protein InlD (ohne S.Peptid): MW=54.759 kDa

3: Aufgereinigtes Protein InlE (ohne S.Peptid): MW=51.847 kDa

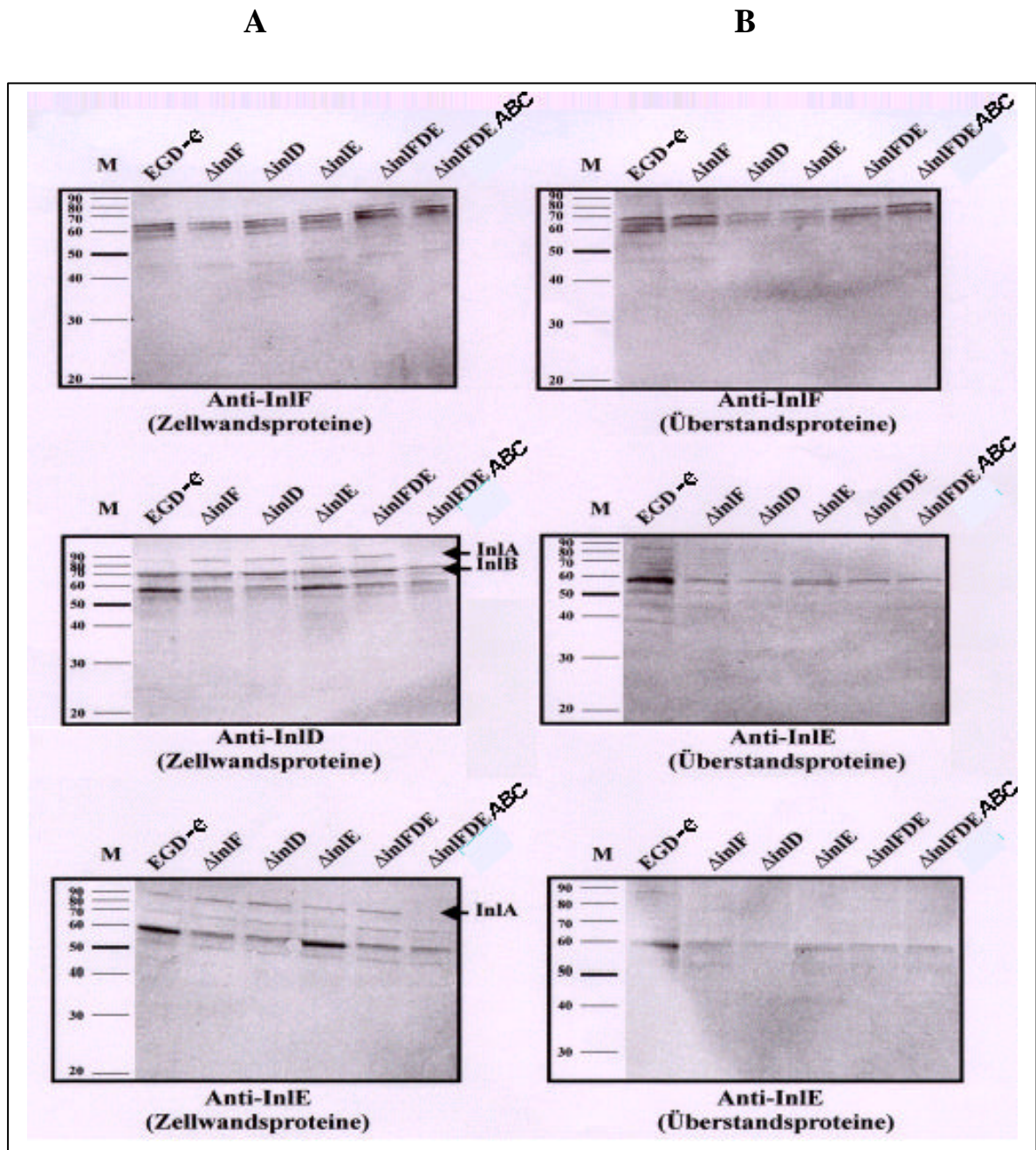


Die Molekulargewichte der gereinigten Fusionsproteine im SDS-PAGE (Abb.34 und 35) entsprachen nur im Falle des InlD-Proteins exakt den kalkulierten Molekulargewichten. Dies ist ein Phänomen, das auch schon bei anderen Listerien-Proteinen beobachtet wurde.

#### 5.10.4 Immunobiochemischer Nachweis von InlF, D und E mit Polyklonalantikörpern

Die durch Immunisierung von Kaninchen aus deren Serum gewonnenen Polyklonalantikörper (siehe 4.32) gegen InlF, InlD und InlE wurden für die Detektion in einem Immunoblot mit Zellwand- und Überstand-Extrakten von *L. monocytogenes* EGD-e Wildtyp,  $\Delta inlF$ ,  $\Delta inlD$ ,  $\Delta inlE$ ,  $\Delta inlFDE$  und  $\Delta inlFDEABC$  eingesetzt.

Unabhängig von den verwendeten Kaninchenseren, ob die Immunisierung nun mit InlF, D oder E erfolgte, waren bei den Zellwand- und Überstandsproteinen der Stämme EGD-e,  $\Delta inlF$ ,  $\Delta inlD$ ,  $\Delta inlE$  und  $\Delta inlFDE$  immer die gleichen Bandenmuster zu sehen. Typisch waren diese Bandenmuster allerdings für das jeweilige Serum. Eine direkte Identifizierung der Proteine InlF, D oder E war weder bei den Zellwandextrakten noch bei den Überstandsfraktionen möglich. Interessanterweise konnten aber Unterschiede bei der Deletionsmutante  $\Delta inlFDEABC$  festgestellt werden: Sowohl beim Immunoblot mit Anti-InlD Antiserum als auch beim Immunoblot mit Anti-InlE Antiserum waren auf der Höhe der Proteine InlA und/oder InlB keine Banden zu sehen. Dies zeigt klar, dass die gewonnenen Kaninchenseren LRR-Proteine von *L. monocytogenes* EGD-e unspezifisch binden. Da von InlF, D und E die Gesamtproteine (ohne Signalpeptid) zur Immunisierung eingesetzt wurden, ist in diesen Fällen von Kreuzreaktionen mit Mitgliedern aus der LRR-Familie von *L. monocytogenes* EGD-e auszugehen. Auf der Basis der Daten von RNA-Analysen, Mausinfektionsversuchen und Reporterstudien wurde in diesem dargestellten Experiment keine spezifischen Banden für InlF und InlE erwartet. Alle Kaninchenseren erkannten die korrespondierenden, gereinigten Proteine (Daten nicht gezeigt).



**Abb.36:** Immunobiochemische Untersuchung der gewonnen polyklonalen Antikörper gegen InlF, gegen InlD und gegen InlE.

A: Zellwandproteine

B: Überstandspoteine

Zur Orientierung sind die Molekulergewichte von InlA und InlB mit Pfeilen markiert.

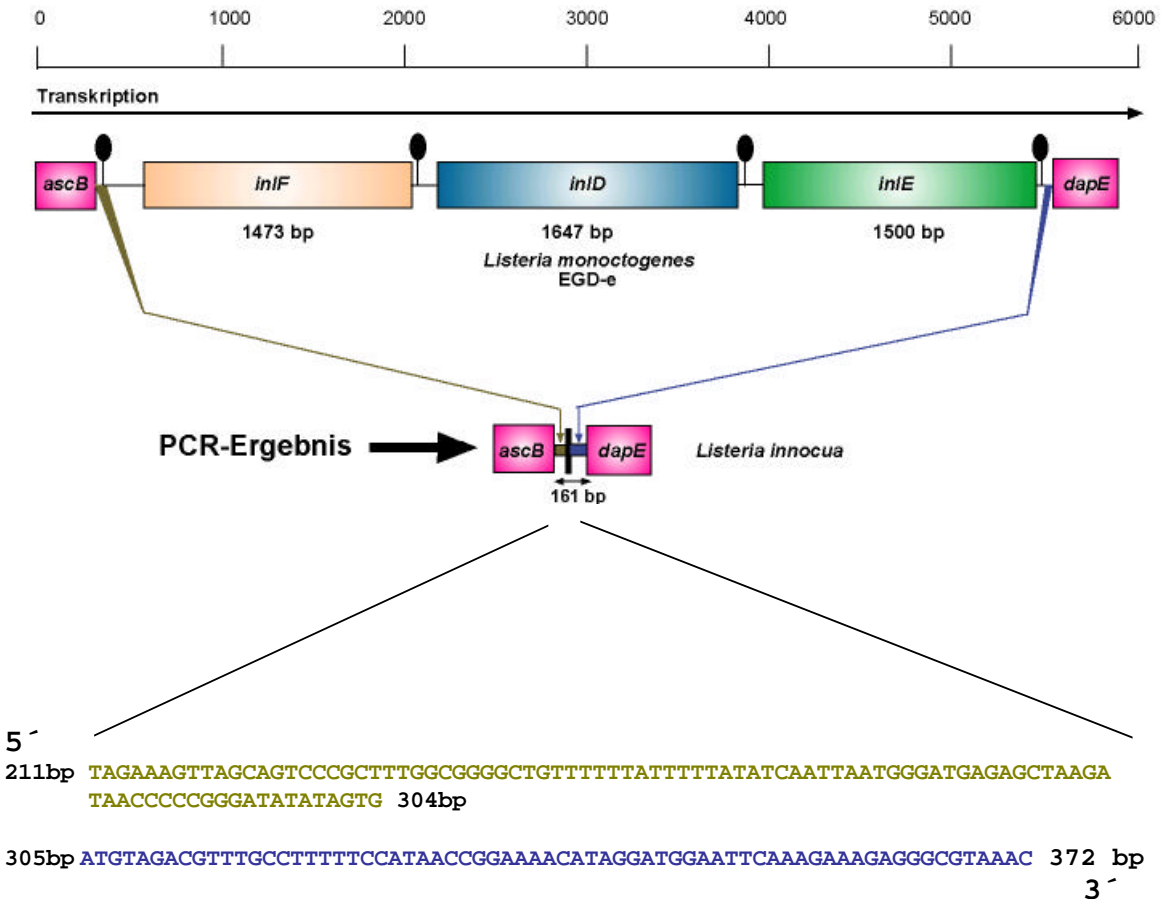
### 5.11 Der *inlFDE*-Locus und flankierende Bereiche in *L. monocytogenes* EGD-e und *L. innocua*

Der *inlFDE*-Locus ist eine weitere Pathogenitätsinsel von *L. monocytogenes* EGD-e und ist von zwei Haushaltsgenen, dem *ascB*- und dem *dapE*-Gen, umgeben. Beide Haushaltsgene spielen wahrscheinlich eine wichtige Rolle im Überleben des Bakteriums. So versorgt z.B. das *ascB*-Genprodukt (Beta-Glucosidase) das Bakterium mit wichtigen Kohlenhydratquellen und *dapE* kodiert für eine Succinyl-Diaminopimelat Desuccinylase, die die Hydrolyse der N-succinyl-L-diaminopimelinsäure zu L-diaminopimelinsäure (L-DAP) und Succinate katalysiert. L-DAP ist der Vorläufer der meso-DAP und ein sehr wichtiger Bestandteil fast aller Bakterienzellwände.

#### 5.11.1 Der *inlFDE*-Locus und flankierende Gene *ascB* und *dapE* in *L. innocua*



Um zu überprüfen, ob der *inlFDE*-Locus bzw. die beiden Haushaltsgene *ascB* und *dapE* auch im apathogenen Stamm *L. innocua* vorhanden sind, wurden die beiden Oligonukleotide *inldebglII1* und *inldebglII2* ausgewählt, die in den kodierenden Regionen dieser Haushaltsgene von *Listeria monocytogenes* EGD-e binden. In der Tat war es mit Hilfe dieser beiden Oligonukleotide möglich, ein spezifisches PCR-Produkt aus der chromosomalen DNA von *L. innocua* zu amplifizieren. Allerdings hatte dieses Amplifikat nur eine Größe von ca. 1 kbp und war damit ca. 6 kbp kürzer als es der Größe des DNA-Abschnittes auf dem *L. monocytogenes* EGD-e-Genom entspricht (siehe Anhang).

Die Sequenzierung dieses PCR-Produktes zeigte dann auch, dass die beiden Haushaltsgene *ascB* und *dapE* in *L. innocua* enthalten sind, aber der gesamte *inlFDE*-Locus fehlt (Abb. 37). Die beiden Haushaltsgene von *L. innocua* sind fast zu 100% identisch mit den beiden Haushaltsgenen von *L. monocytogenes* EGD-e. Das DNA-Fragment zwischen den beiden Haushaltsgenen von *L. innocua* beträgt 161 bp und ist zu ca. 51% identisch zu der intergenischen *ascB-inlF*-Region und zu ca. 80% identisch zu der intergenischen *inlE-dapE*-Region von *L. monocytogenes* EGD-e. Dieses Ergebnis bedeutet, dass die beiden Haushaltsgene *ascB* und *dapE* bei beiden Listeren-Arten hoch konserviert und auf den beiden Genomen auch gleich angeordnet sind. Aus diesen Daten kann nicht abgeleitet werden, ob sie auch an der gleichen Stelle in den Genomen lokalisiert sind. Weiterhin ist das *inlFDE*-DNA-Fragment spezifisch für *L. monocytogenes* EGD-e und kann somit als eine weitere Pathogenitätsinsel von *L. monocytogenes* EGD-e bezeichnet werden (siehe auch oben).



**Abb.37:** Schematische Darstellung der beiden Loci in *L. monocytogenes* EGD-e und in *L. in nocua* mittels PCR mit den beiden Oligonukleotiden inldebIII1 und inldebIII2 die an die beiden Haushaltgene *ascB* und *dapE* binden. ● = Terminator

**Abb.38:** Nukleotidsequenzvergleich der intergenischen Regionen zwischen *ascB* und *dapE* von *L. innocua* und *L. monocytogenes* EGD-e mit Hilfe des Programms HUSAR (Heidelberg Unix Sequence Analysis Resources).

 *L. innocua*  
 *L. monocytogenes*

[illegible]

### 5.11.2 Herstellung einer *dapE*-Deletionsmutante

Wie bereits in der Literatur beschrieben, kodiert *dapE* für eine Succinyl-Diaminopimelat Desuccinylase, die die Hydrolyse der N-succinyl-L-diaminopimelinsäure zu L-diaminopimelinsäure (L-DAP) und Succinate katalysiert. L-DAP ist der Vorläufer der meso-DAP und ein sehr wichtiger Bestandteil fast aller Bakterienzellwände.

Durch die Entdeckung eines *dapE*-Gens in *L. monocytogenes* EGD-e in der vorliegenden Arbeit war es möglich geworden, eine attenuierte *dapE*-Mutante als biologischen Sicherheitsstamm von *L. monocytogenes* EGD-e herzustellen. Das Ziel war, eine auxotrophe Mutante herzustellen, die nur in Anwesenheit von L-Diaminopimelinsäure (L-DAP) wachsen kann. Sollte dieser Stamm aus dem Labor „entkommen“, würde ihm ein essentieller Baustein zur Herstellung der Zellwand fehlen und er würde absterben. Solche Stämme eignen sich besonders als Empfängerorganismen für Expressionsplasmide und könnten z. B. in der Gentherapie und zur Herstellung von Vakzinstämmen verwendet werden. Ähnliche *dapE*-Mutanten wurden bereits bei anderen Bakterien, wie z.B. bei *Helicobacter pylori* als Vakzinastamm (Karita et al., 1997), konstruiert.

Zur Herstellung der „in frame“-Deletionsmutante im *dapE*-Gen wurden in einer PCR zwei DNA-Fragmente mit den Primern 6516/*dapE*-NotIA und *dapE*-NotIB/*dapE* so amplifiziert, dass die zusammengesetzten PCR-Produkte eine Deletion „in frame“ von ca. 80% des Gens beinhalten. Die genaue Beschreibung des weiteren Verfahrens zur Herstellung von Deletionsmutanten innerhalb Listerien ist unter 4.19 beschrieben. Die Mutante wurde mittels PCR und Sequenzierung überprüft. Leider zeigte sich bei der Anzucht dieses *dapE*-defizienten Stammes kein Unterschied im Wachstum in Anwesenheit oder in Abwesenheit von L-DAP als Zusatz zum Medium. Dies bedeutet, dass das hier gefundene *dapE*-Gen offensichtlich nicht das einzige *dapE*-Gen in *L. monocytogenes* EGD-e sein kann, so dass die Mutation von den Bakterien kompensiert wurde. Die hergestellte Deletionsmutante ist phänotypisch nicht vom Wildtyp zu unterscheiden, auch im Mausinfektionsmodell war kein Unterschied zum Wildtyp zu beobachten.

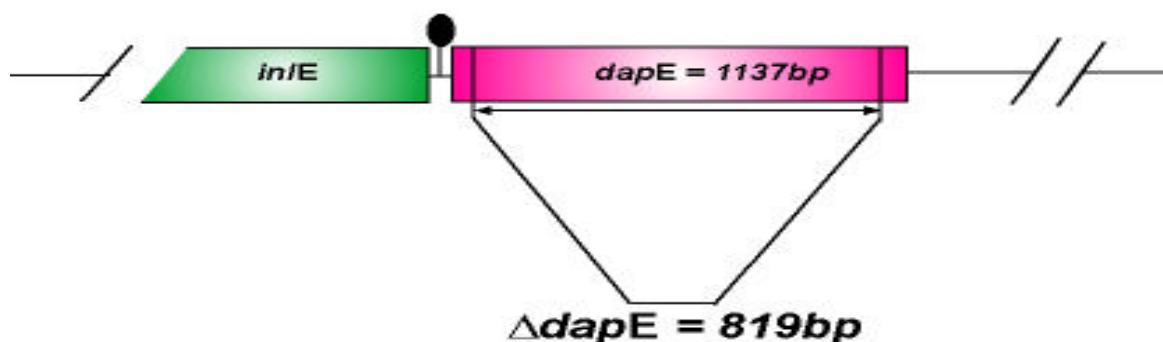


Abb. 39: Schematische Darstellung der Herstellung der *dapE*-Deletionsmutante



### 5.12 Herstellung von NotI-Deletionsmutanten zur Kartierung des Listerien-EGD-e Genoms

Das Chromosom von *L. monocytogenes* EGD-e Serotyp 1/2a wurde im Institut für Med. Mikrobiologie, Giessen, durch Restriktionsanalyse kartiert und kann in verschiedene Fragmente eingeteilt werden (Von Both et al., 1999). Da das listerielle Chromosom sehr AT-reich ist, eignen sich Restriktionsendonukleasen mit einer GC-reichen Erkennungssequenz, wie z. B. NotI und AscI besonders gut zur Restriktionskartierung, da hierbei nur wenige, große DNA-Fragmente entstehen, die in einem gepulsten Elektrophoresesystem getrennt werden können (Schwarz et Cantor, 1984).

Bis jetzt wurden drei verschiedene Gencluster in *L. monocytogenes* beschrieben, die Pathogenitätsfaktoren beinhalten: die Cluster *prfA-plcA-hly-mpl-actA-plcB*, *inlAB* und *inlFDE*. Zwei weitere Gene konnten mit Virulenzeigenschaften assoziiert werden, sind aber als individuelle Gene auf dem Genom organisiert: *flaR* (Sanchez-Campillo M et al., 1995) und *irpA* (Domann et al., 1997). Das Ziel war, die relative Anordnung dieser Gene und deren Lokalisation in spezifischen Regionen zu bestimmen. Hierzu wurden künstlich NotI-Schnittstellen in die oben beschriebenen Loci eingefügt, um isogene Mutantanten mit neuen NotI-Schnittstellen im Genom herzustellen (Tab. 10).

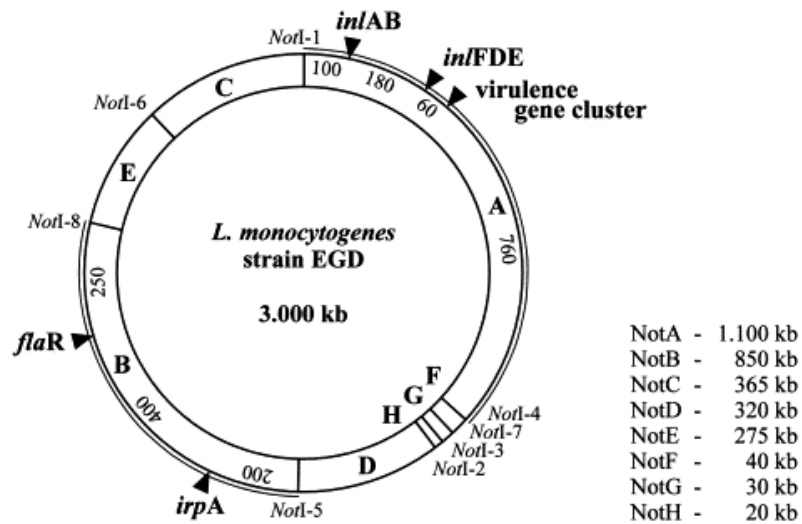
PFGE-Analysen chromosomaler, NotI verdauter DNA resultierte bei der  $\Delta actA-plcB$  Mutante in zwei neuen NotI Fragmenten von 760 und 340 kb anstatt des original 1100 kb NotI-Fragmentes, was die Lokalisation dieses Genabschnittes auf dem NotA-Fragment ermöglichte. Auf die gleiche Art und Weise konnte das *inlAB*-Operon und der *inlFDE*-Locus auf demselben NotA-Fragment lokalisiert werden. Die Orientierung der Loci auf dem NotA-Fragment wurde durch drei Doppeldeletionsmutanten und eine Tripeldeletionsmutante erreicht: *PprfABox(inlAB) $\Delta actA-plcB$* , *PprfABox(inlAB) $\Delta inlFDE$* ,  $\Delta actA-plcB \Delta inlFDE$  und *PprfABox(inlAB) $\Delta actA-plcB \Delta inlFDE$*  (Tab. 10) und ist in der Abb. 40 dargestellt.

Bezeichnung
<b>DinlF in DinlABDirpADVGC</b>
<b>DinlD in DinlABDirpADVGC</b>
<b>DinlE in DinlABDirpADVGC</b>
<b>DinlFDE in DinlABDirpADVGC</b>
<b>DPprfA-Box in DactAplcB</b>
<b>DPprfA-Box in DinlFDE</b>
<b>DactAplcB in DinlFDE</b>

Tab.10: Hergestellte NotI-Deletionsmutanten



**Abb. 40:** Chromosomenkarte von *Listeria monocytogenes* EGD-e (Von Both et al., 1999). Die aus der Restriktionsspaltung mit NotI hervorgegangenen Fragmente (A-H) wurden dargestellt. Die Abschnitte, denen Gene zugeordnet werden konnten, sind entsprechend beschriftet. [*inl*= Internaline; *flaR* = Flagellinregulator; *irpA* = Internalin related protein]



TEIL II:**Regulation des *inlAB*-Operons****5.13 Herstellung von Deletions- bzw. Substitutionsmutanten in der *PprfA*-Box des *inlAB*-Operons**

In der Promotorregion des *inlAB*-Operons liegt ca. 440 bp stromaufwärts des *inlA*-Gens eine PrfA (positive regulation factor A) Erkennungssequenz (TTAACATAAGTTAA), an die der Transkriptionsregulator bindet. Diese als PrfA-Box bezeichnete Nukleotidsequenz wurde experimentell bestimmt (Lingnau et al., 1995). In diesem Teil der Arbeit sollte die Frage beantwortet werden, welche Rolle diese Erkennungssequenz bei der PrfA-abhängigen Regulation des *inlAB*-Operons spielt. Hierzu wurden zwei Strategien verfolgt: Erstens, chromosomale Deletion der 12 Basenpaare langen Erkennungssequenz. Zweitens, Substitution der 12 Basenpaare langen Erkennungssequenz, um eventuelle sterische Störungen im Promotor durch die Deletion zu vermeiden.

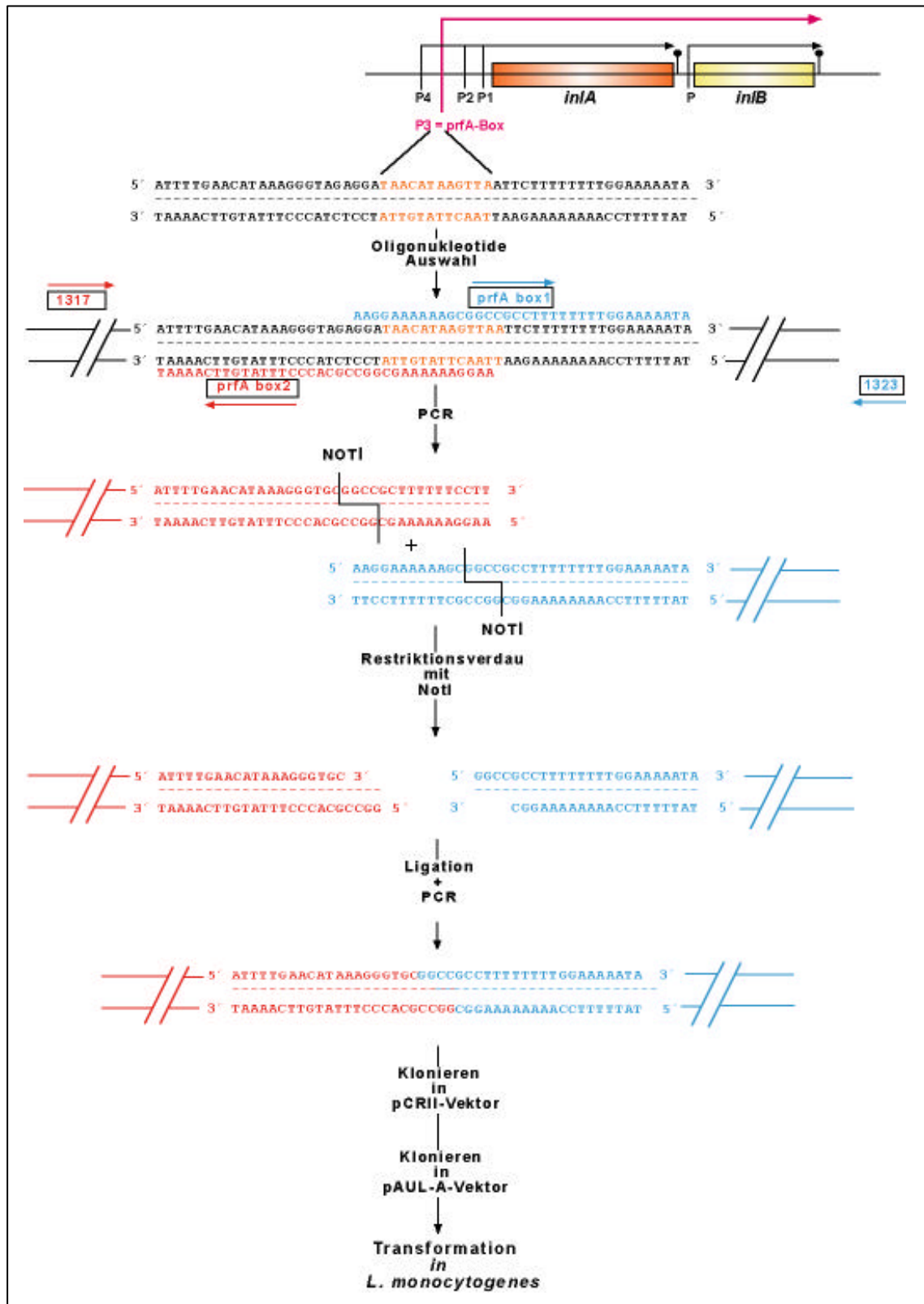
**5.13.1 Deletion der 12 Basenpaare langen *prfA*-Box im Promotor des *inlAB*-Operons**

Bei dieser Deletionsmutante sollte eine Wechselwirkung von PrfA mit der Erkennungssequenz TTAACATAAGTTAA verhindert werden. Es wurde erwartet, dass die Induktion der Internaline A und B stark reduziert oder sogar vollständig unterbunden wird und somit keine Invasion von Wirtszellen stattfindet.

Zur Herstellung der *PprfA*-Box (12bp)-Deletionsmutante ( $\Delta PprfA$ -Box) wurden in einer PCR zwei DNA-Fragmente so amplifiziert, dass die zusammengesetzten PCR-Produkte eine Deletion von **12 bp** der *PprfA*-Box beinhalten. Zwei DNA-Fragmente von **382 bp** bzw. **703 bp** wurden für diese PCR mit den Oligonukleotidpaaren **1317** und **prfAbox2** bzw. **prfAbox1** und **1323** amplifiziert und mit NotI verdaut und für 5 h ligiert. Danach wurden die ligierten Fragment mit den Oligos **1317** und **1323** amplifiziert und das **1.089 kb** PCR-Fragment in den pCRII-Vektor kloniert. Das Insert wurde HindIII/XbaI in **pAUL-A** umkloniert. Das entstandene rekombinante Plasmid erhielt die Bezeichnung **pAD29** und wurde in *L. monocytogenes* EGD-e-Protoplasten transformiert und die Deletion wie im Material- und Methodenteil beschrieben hergestellt. Mittels einer PCR mit dem Oligonukleotidpaar **1317/1323** wurden die erhaltenen Erythromycin-sensitiven Listerien auf die Deletion hin

überprüft. Die chromosomale Deletion wurde mittels Restriktionsverdau mit NotI und Sequenzierung überprüft.

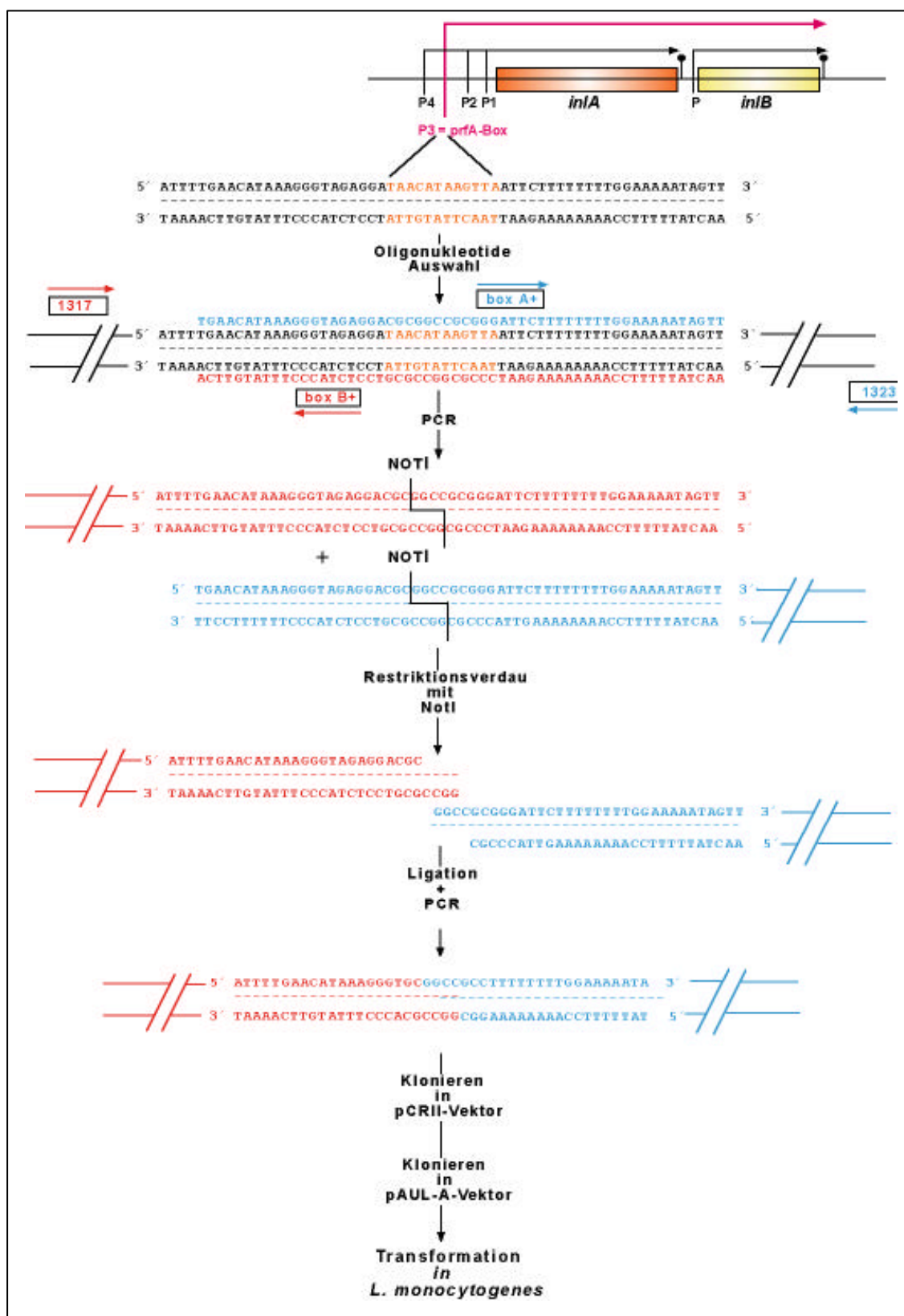
**Abb. 41:** Darstellung der Konstruktion der  $\Delta prfA$ -Box-Deletionsmutante.



### 5.13.2 Substitution der 12 Basenpaare langen *PprfA*-Box im Promotor des *inlAB*-Operons

Um eine sterische Veränderung des Promotors durch eine Deletion zu vermeiden, sollte eine chromosomale Substitution der *PrfA*-Erkennungssequenz eingefügt werden. Für diesen Austausch wurde eine Sequenz für das Restriktionsenzym *NotI* gewählt, so dass auch in diesem Bereich des Chromosoms eine weitere *NotI*-Schnittstelle eingefügt wurde (von Both et al., 1999).

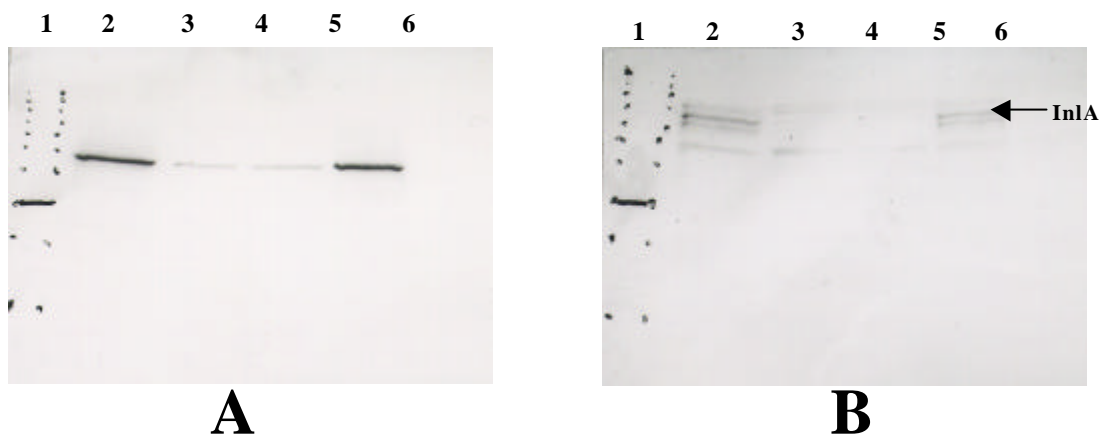
Zur Herstellung der Subst.*PprfA*-Box (12bp)-Substitutionsmutante wurden in einer PCR zwei DNA-Fragmente so amplifiziert, dass die zusammengesetzten PCR-Produkte einen Austausch von genau **12 bp** der *PprfA*-Box beinhalten. Zwei DNA-Fragmente von **407 bp** bzw. **723 bp** wurden für diese PCR mit den Oligonukleotidpaaren **1317** und **BoxB** bzw. **BoxA** und **1323** amplifiziert, mit *NotI* verdaut und für 5 h ligiert. Danach wurden die ligierten Fragmente mit den Oligos **1317** und **1323** amplifiziert und das **1.089 kb** PCR-Fragment in den pCRII-Vektor kloniert. Das Insert wurde *HindIII/XbaI* in **pAUL-A** umklont. Das entstandene rekombinante Plasmid erhielt die Bezeichnung **pAD31** und wurde in *L. monocytogenes* EGD-e-Protoplasten transformiert. Mittels einer PCR mit dem Oligonukleotidpaar **1317/1323** wurden die erhaltenen Erythromycin-sensitiven Listerien auf die Deletion hin überprüft. Die Deletion wurde mittels Restriktionsverdau mit *NotI* und Sequenzierung überprüft.

Abb. 42: Darstellung der Konstruktion der Subst.*PprfA*-Box Substitutionsmutante.

### 5.14 Immunobiochemische Untersuchung der DPprfA- bzw. Subst.PprfA-Box Mutanten

Zur Immunbiochemischen Untersuchung der  $\Delta$ PprfA- bzw. Subst.PprfA-Box wurden die Zellwand-Proteine des Wildtyps *L.monocytogenes* EGD-e (positive Kontrolle), der beiden Mutanten  $\Delta$ inlAB2,  $\Delta$ prfA2 (negative Kontrolle) und der  $\Delta$ - bzw. Subst.-PprfA-Box im SDS-Gel und Immunoblot ( mit dem monoklonalen Antikörper L244 für InlA und IF32F8 für InlB ) untersucht. Das Gen *inlA* kodiert für ein Membranprotein von 82,6 kDa, das Gen *inlB* kodiert für ein Protein von 67,2 kDa.

Folgende Ergebnisse wurden erzielt:



**Abb. 43:** Immunobiochemische Untersuchungen der Zellwandproteine der PprfA-Box-Deletions- bzw. Substitutionsmutanten.

**A:** Immunoblot nach Detektion mit IF32F8 Antikörper, gerichtet gegen InlB

**B:** Immunoblot nach Detektion mit L244 Antikörper, gerichtet gegen InlA

1: Molekulargewichtsmarker

2: Wild-Typ-Zellwandproteine

3:  $\Delta$ prfA-Box-Zellwandproteine

4: Subst.PprfA-Box-Zellwandproteine

5:  $\Delta$ prfA2-Zellwandproteine

6:  $\Delta$ inlAB2-Zellwandproteine

In beiden Fällen zur Detektion von InlA und InlB sind beim Wildtyp die Proteine nachweisbar. Überraschenderweise konnte aber auch bei der Deletionsmutante  $\Delta$ prfA2 in etwa die gleiche Menge an Internalin A und B nachgewiesen werden, obwohl in Anlehnung an frühere Ergebnisse zumindest eine signifikante Verminderung zu erwarten war (Lingnau et al., 1995). Überraschenderweise konnten aber nur Spuren von InlA und InlB bei den beiden Mutanten  $\Delta$ PprfA- bzw. Subst.PprfA-Box gefunden werden. Dies bedeutet, dass das Fehlen von PrfA kaum einen Einfluß auf die Transkription dieses Operons hat, aber das Fehlen der Operatorsequenz in der -44 Region des InlAB-Promotors einen erheblichen

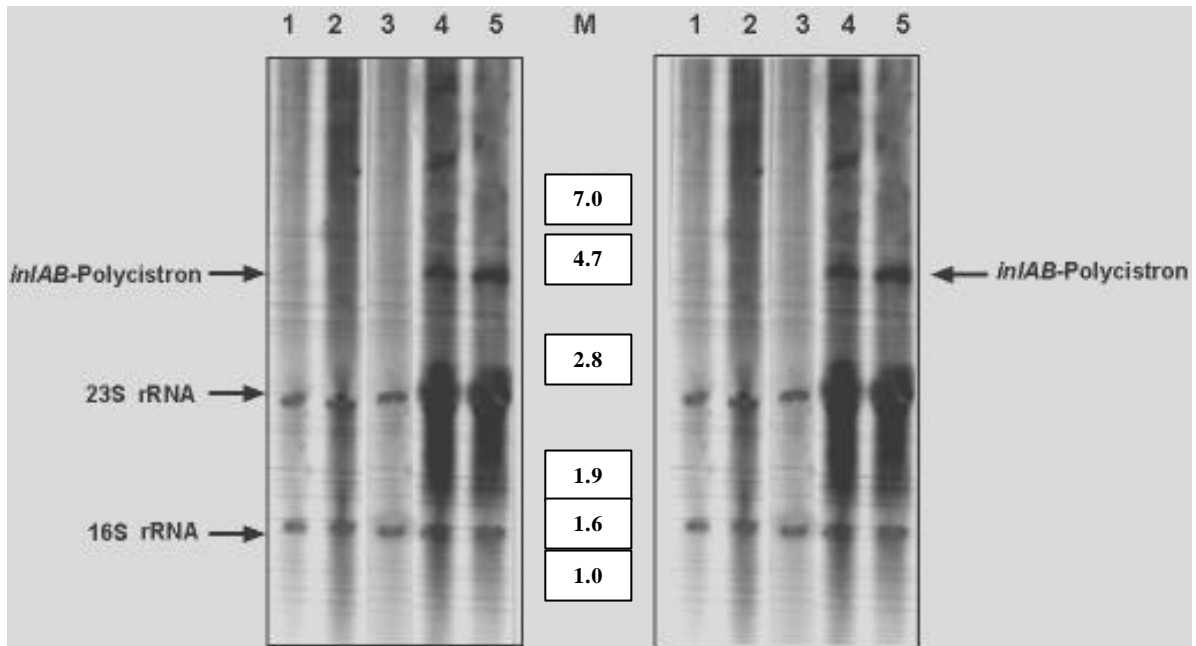
Einfluss zeigt. Offensichtlich ist ein anderer, nicht mit PrfA identischer Transkriptionsregulator für die Expression des Internalin-Operons erforderlich. Die Ergebnisse dieses Versuches sind in der folgenden Tabelle dargestellt.

Stamm	Bandestärke
EGD-e (+ Kont.)	++++
$\Delta prfA2$ (- Kont.)	+++
$\Delta inlAB2$ (- Kont.)	-
$\Delta PprfA$ -Box	+ (verursacht durch die schwachen Promotoren)
Subst. $PprfA$ -Box	+ (verursacht durch die schwachen Promotoren)

#### 5.15 Nachweis der *inlAB*-Transkripte in verschiedenen Listerien-Stämmen mittels RNA-DNA Hybridisierung (Northern Blot)

Zum Nachweis der *inlAB*-Transkripte wurden RNA-DNA-Hybridisierungsstudien durchgeführt. 5 µg Gesamt-RNA vom EGD-e-Wildtyp (positive Kontrolle),  $\Delta inlAB2$  (negative Kontrolle),  $\Delta prfA2$  und der  $\Delta$  bzw. Subst.- $PprfA$ -Box wurden dazu auf einem Formaldehydgel aufgetrennt. Die Analyse erfolgte durch Northern Blot und Hybridisierung mit Sonden gegen die einzelnen *inlAB*-Gene.

Die Analyse der Transkripte der *inlAB*-Gene im Northern Blot ergab ein Transkript von ca. 4.400 bp Länge, das sowohl beim Wildtyp EGD-e (positive Kontrolle) als auch bei  $\Delta prfA2$  Deletionsmutante zu finden war. Die erhaltene Transkriptlänge stimmt mit der kalkulierten Länge der polycistronischen mRNA von *inlAB* überein. Sowohl bei der  $\Delta inlAB2$  Deletionsmutante (negative Kontrolle) als auch bei den Mutanten  $\Delta$  bzw. Subst.- $PprfA$ -Box konnten keine Tanskripte nachgewiesen werden. Eine schwache Hybridisierung der verwendeten Sonden mit der 16S und 23S rRNA konnte bei allen Hybridisierungen beobachtet werden.



**Abb. 44:** RNA-DNA-Hybridisierung mit Dig markierten DNA-Sonden gegen die Transkripte von *inlA* und *inlB*.

Pfeile= Die erhaltenen Transkripte.

1: Subst.*PprfA*-Box

2:  $\Delta$ *PprfA*-Box

3:  $\Delta$ *inlAB2*

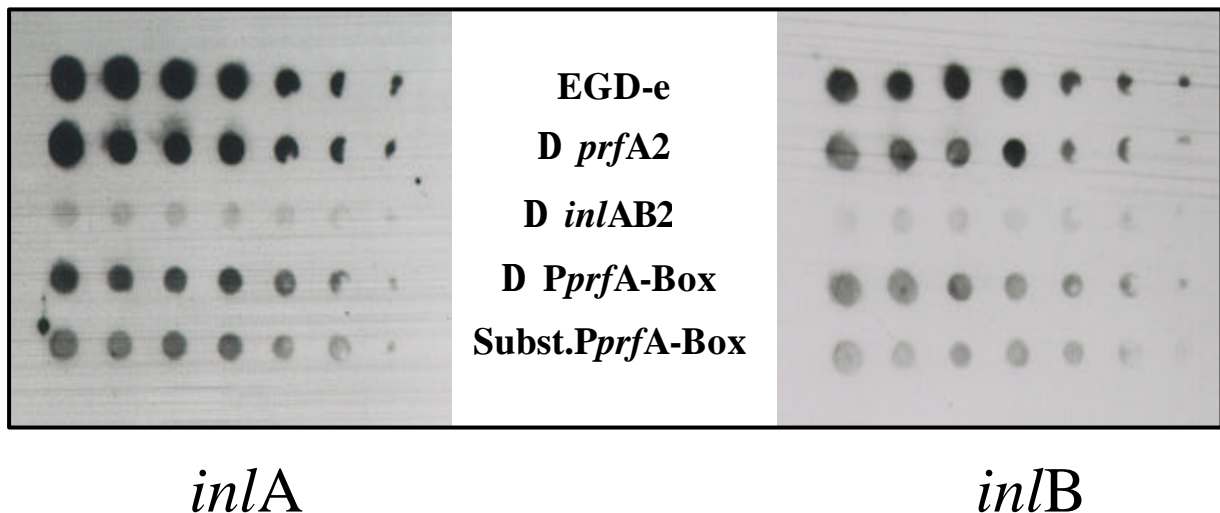
4:  $\Delta$ *prfA2*

5: *L. monocytogenes* EGD-e

### 5.16 Nachweis der *inlAB*-Transkriptintensität der verschiedenen *Listerien*-Stämme mittels Dot-Blot-Methode

Zum Nachweis der beiden *inlAB*-Transkriptintensitäten wurden RNA-DNA-Hybridisierungsstudien mittels der Dot-Blot-Methode durchgeführt. 0.5 bis 25µg Gesamt-RNA von EGD-e Wildtyp (positive Kontrolle),  $\Delta$ *prfA2*,  $\Delta$ *inlAB2* (negative Kontrolle) und der  $\Delta$ - bzw. Subst.-*PprfA*-Box wurden dazu in eine Blot-Apparatur gebracht und mittels Vakuum durchgesaugt, wodurch die Nukleinsäuren an der Nitrozellulosemembran hängenblieben und anschließend in UV-Licht fixiert wurden (siehe Methodenteil). Die Analyse erfolgte durch Hybridisierung mit Sonden gegen die einzelnen *inlAB*-Gene. Die Auswertung der Transkriptstärken der *inlAB*-Gene im Dot-Blot ergab ähnliche Transkriptstärken bei der positiven Kontrolle EGD-e und bei  $\Delta$ *prfA2*. Sowohl bei der  $\Delta$ *inlAB2* Mutante (negative Kontrolle) als auch bei den beiden Mutanten  $\Delta$ - bzw. Subst.-*PprfA*-Box waren nur schwache Transkripte nachzuweisen.





**Abb. 45:** Ergebnisse der Dot-Blot-Versuche (Transkriptstärken von *inlA* und *inlB*) durch RNA-DNA-Hybridisierungen mit Dig markierten DNA-Sonden gegen die Transkripte von *inlA* und *inlB*.

### 5.17 Infektionsversuche am Zellkulturmodell

Die Deletionsmutante *PprfA-Box* und die Substitutionsmutante *PprfA-Box* besitzen eine Deletion bzw. eine Substitution im Bereich der 12 bp der *PprfA-Box*. Wie die oben beschriebenen Ergebnisse zeigen, werden bei diesem Typ von Mutanten nur noch geringe Transkriptmengen und damit auch Proteine von InlA und InlB produziert.

Um festzustellen, ob die Menge an Genprodukten von *inlAB* bei diesen Veränderungen der *PprfA-Box* für die Internalisation ausreichend sind, wurden Infektionsversuche am Zellkulturmodell durchgeführt. Die Infektionsversuche wurden mit den Stämmen EGD-e (positive Kontrolle),  $\Delta inlAB2$  (negative Kontrolle),  $\Delta prfA2$ ,  $\Delta PprfA-Box$  und Subst.*PprfA-Box* durchgeführt. Alle Kulturen befanden sich zum Zeitpunkt der Infektion in der logarithmischen Wachstumsphase ( $OD_{600nm}$  ca. 0.8). Jeder Stamm wurde bei 37°C auf Infektionsfähigkeit getestet. Infiziert wurden Caco-2- und HeLa-Zellen. Die Analyse der Infektion der *PprfA-Box*-Deletionsmutanten bzw. *PprfA-Box*-Substitutionsmutante in Caco-2 und HeLa-Zellen ergab signifikante Unterschiede zur wildtypischen Infektion (Abb. 46 u. 47). Die Invasionsfähigkeit der *PprfA-Box*-Deletionsmutante bzw. *PprfA-Box*-Substitutionsmutante war sehr gering und verhielt sich bei der Internalisation im Fall von HeLa-Zellen genau wie die beiden Stämme  $\Delta inlAB2$  und  $\Delta prfA2$ , d.h., sie sind nicht mehr in der Lage, Wirtszellen zu invadieren. Das gleiche Ereignis kann ebenfalls bei Caco-2-Zellen beobachtet werden, nur im Falle des Stammes  $\Delta prfA2$  kann gezeigt werden, dass trotz der Abwesenheit des PrfA-Transkriptionsregulators eine geringfügig höhere Invasionsrate von 1 % festzustellen war (Abb. 47).

Abb. 46: Invasionsverhalten von Listerien-Mutanten in HeLa-Zellen

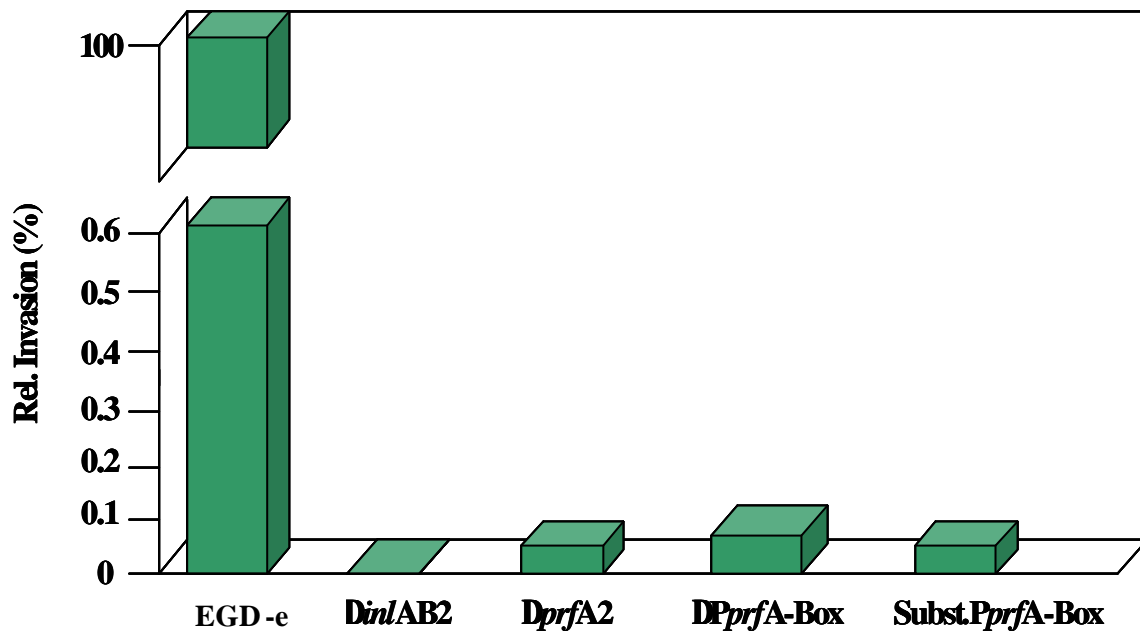
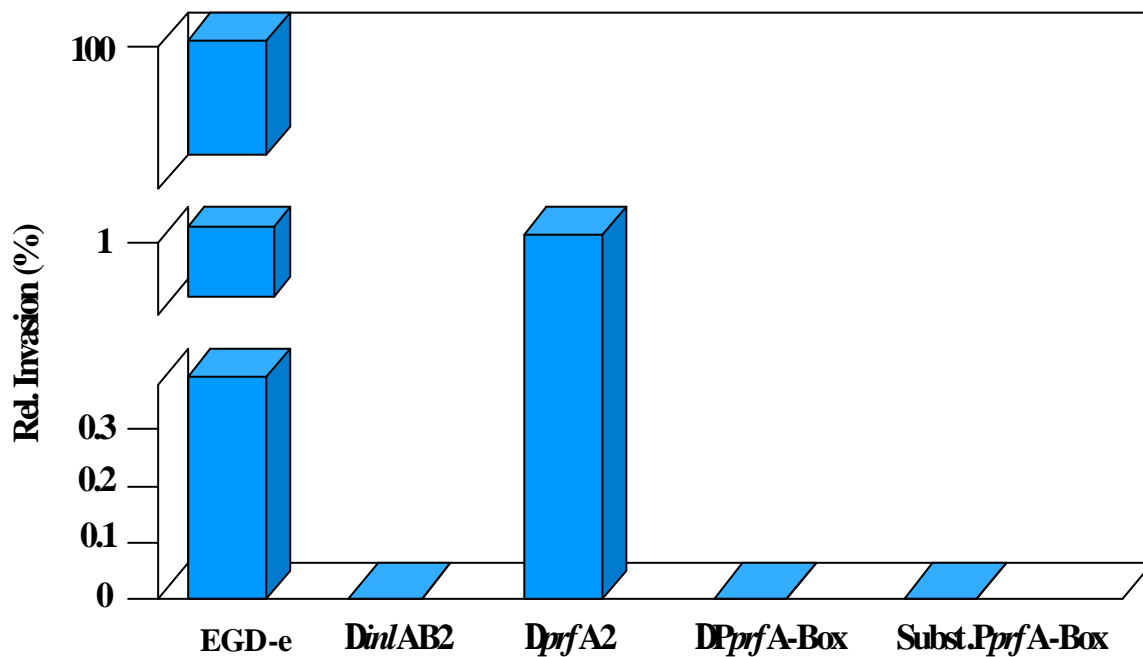


Abb. 47: Invasionsverhalten von Listerien-Stämmen in Caco-2-Zellen



Aus diesen Ergebnissen können zwei Schlüsse gezogen werden: Zum einen reicht die geringe Menge an InlA und InlB, die an der Oberfläche der Bakterien bei den Mutanten  $\Delta PprfA$ -Box und *Subst.PprfA-Box* gefunden wurden, nicht aus, Wirtszellen effizient zu

invadieren. Zum anderen reichen die Internaline im Falle einer reichlichen Menge an Proteinen auf der Oberfläche der  $\Delta$ prfA2 Mutante ebenfalls nicht aus, um effizient zu invadieren.

## 6. DISKUSSION

Listerien sind ubiquitäre Bakterien, die aus dem Erdboden, aus Oberflächengewässern, von Pflanzenresten, aus Silagen und Abwässern und aus asymptomatischen Trägern isoliert werden können. Die Gattung *Listeria* umfasst sechs verschiedene Arten, von denen *L. monocytogenes* pathogen für Menschen und Tiere und *L. ivanovii* nur pathogen für Tiere ist. Der Unterschied zwischen pathogenen und nicht-pathogenen Listerien lässt sich an der Fähigkeit feststellen, Wirtszellen zu invadieren, sich intrazellulär zu vermehren und zu bewegen und sich von Zelle zu Zelle auszubreiten.

Die Faktoren, die hauptsächlich an der Virulenz von *L. monocytogenes* beteiligt sind, sind auf dem Genom in einem Cluster aus 5 Genen angeordnet, *plcA* (Phosphatidylinositol-spezifische Phospholipase C), *hly* (Hämolysin), *mpl* (Metalloprotease), *actA* (Aktinfilament akkumulierender Faktor) und *plcB* (Phosphatidylcholin-spezifische Phospholipase C). Eine Mutation innerhalb eines dieser fünf Gene kann die Virulenz des Bakteriums reduzieren (Goebel et al., 1993). Weiterhin ist in diesem Genomabschnitt auch der Transkriptionsregulator *prfA* enthalten, der diese fünf Gene positiv reguliert. Das Virulenzgencluster kommt in *L. monocytogenes* (human- und tierpathogen) und auch in *L. ivanovii* (nur tierpathogen) vor, wo die Gene zwar genauso angeordnet sind, aber signifikante Homologieunterschiede zeigen. Das Cluster wurde ebenfalls in *L. seeligeri* (apathogen) gefunden, aber die Pathogenitätsfaktoren sind durch Insertionen unterbrochen, es haben sich viele Mutationen akkumuliert und es ist sogar teilweise zu Genduplikationen (z. B. in *plcB*) gekommen. Flankiert wird das Virulenzgencluster von den Genen *ldh* (Lactat-Dehydrogenase) und *prs* (Phosphoribosylsynthetase), die in allen Listerien vorkommen (Chakraborty et al., 2000; Gouin et al., 1994).

*L. monocytogenes*-Bakterien werden aktiv von Makrophagen durch Phagozytose aufgenommen oder induzieren ihre eigene Phagozytose bei nicht-professionellen Phagozyten. Sie können dadurch eine Reihe von Wirtszellen infizieren: Fibroblasten, Hepatozyten, Epithelzellen, Endothelzellen. Pathogene Listerien sind dadurch in der Lage, im infizierten Wirt wichtige Schutzbarrieren zu überwinden. So überwinden sie nach oraler Aufnahme zunächst die Darmbarriere und gelangen in Blut und Lymphe. Anschließend können sie die Blut-Hirn-Schranke überwinden und eine Meningitis auslösen. Im Falle einer schwangeren Frau können sie die Plazentaschranke überwinden und den Fötus infizieren.

An der parasiteninduzierten Phagozytose sind maßgeblich die beiden durch die Gene *inlA* und *inlB* kodierten Invasionsproteine InlA und InlB beteiligt, die eine Funktion bei der Adhäsion an Wirtszellen und bei deren Invasion haben. Sie gehören zur Gruppe der Leucin-reichen Repeat (LRR) Proteine und vermitteln *L. monocytogenes* Wirtszellspezifitäten. So ist InternalinA alleine ausreichend für die Invasion in die Darmepithelzelllinie Caco-2 (Gaillard et al., 1991), während

InternalinB ausreichend ist für die Invasion in U-373, Henle407, HeLa (Ireton et al., 1996), L-929, Huvec (Parida et al., 1998) und Vero-Zellen ist. Allerdings wirkt InternalinB bei der Invasion in Caco-2-Zellen als Invasionsverstärker. Bei Hep-G2 (Dramsi et al., 1995), PtK2, A549 und HT-29 sind beide Internaline in der Lage, die Invasion der Bakterien zu vermitteln (Hain, 1999).

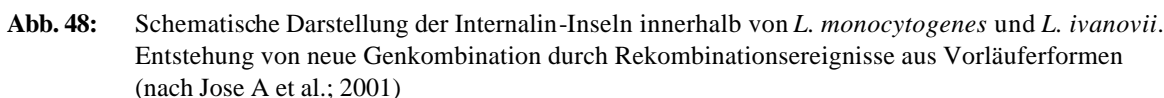
Dadurch ist *L. monocytogenes* mit zwei Molekülen ausgestattet, die die Infektion einer Vielzahl von Wirtszellen vermitteln. Da dieser Erreger aber ubiquitär vorkommt und ganz verschiedene Habitate besiedeln kann, sollte in der vorliegenden Arbeit die Frage geklärt werden, ob im Genom von *L. monocytogenes* weitere Moleküle aus der Gruppe der LRR-Proteine vorhanden sind, die an der Invasion von Wirtszellen und/oder Protein-Protein-Wechselwirkungen beteiligt sind.

Durch eine Subtraktionshybridisierung zwischen pathogenen und nicht pathogenen Listerien wurden *L. monocytogenes*-spezifische DNA-Sequenzen identifiziert (Buske, Doktorarbeit 2001; Chen et al., 1993). Eine dieser Sequenzen besaß signifikante Homologien zu den Leucin-reichen Repeats von InlA/B. In der vorliegenden Arbeit wurden diese kurzen, bekannten DNA-Sequenzen herangezogen, um das komplette korrespondierende Gen inklusive flankierender Sequenzen mittels inverser PCR und „Chromosome Walking“ von *L. monocytogenes* EGD-e zu klonieren. Durch diese Arbeit konnte der *inlFDE*-Locus aus diesem Stamm identifiziert und vollständig kloniert und sequenziert werden.

Die erste Frage, die beantwortet werden sollte, lautete: Handelt es sich bei dem *inlFDE*-DNA-Fragment tatsächlich um *L. monocytogenes*-spezifische DNA, die nicht in *L. innocua* vorkommt? Hierzu wurden als erstes PCR's mit *inlF*-, D- und E-spezifischen Primern und *L. innocua*-DNA durchgeführt. Alle diese PCR's erbrachten aber kein Amplifikat (Daten nicht gezeigt). Dies ließ zwei Interpretationen zu: Erstens, die *inlFDE*-Gene sind in *L. innocua* nicht vorhanden. Zweitens, die Gene sind in *L. innocua* vorhanden, sind aber so stark mutiert, dass die verwendeten Primer nicht mehr spezifisch binden. Aus diesem Grund wurde eine PCR mit Primern durchgeführt, die in den flankierenden Haushaltsgenen *ascB* und *dapE* binden. In der Tat konnte aus *L. innocua* ein DNA-Fragment isoliert und sequenziert werden. Die vergleichende Sequenzanalyse zwischen *L. monocytogenes* und *L. innocua* ergab, dass die Gene *inlFDE* in *L. innocua* nicht vorhanden sind, die Sequenzen zwischen den Haushaltsgenen *ascB* und *dapE* aber eine sehr hohe Übereinstimmung aufwiesen. Dieses Ergebnis hat zu dem Schluss geführt, dass *L. innocua* keine *inlFDE*-Gene besitzt, aber die Gene *ascB* und *dapE* ebenfalls vorhanden und sogar gleich angeordnet sind. Dieses Ergebnis wurde durch zwei Arbeiten unterstützt, die zu dem gleichen Schluss kamen (Dramsi et al., 1997; Raffelsbauer et al., 1998). Es kann somit klar festgestellt werden, dass die *inlFDE*-Gene *L. monocytogenes*-spezifisch sind. Ob diese Genprodukte an der Pathogenität und Virulenz beteiligt sind, sollte durch geeignete Experimente untersucht werden, die unten beschrieben sind. In diesem Falle wäre der *inlFDE*-DNA-Abschnitt als Pathogenitätsinsel zu bezeichnen.

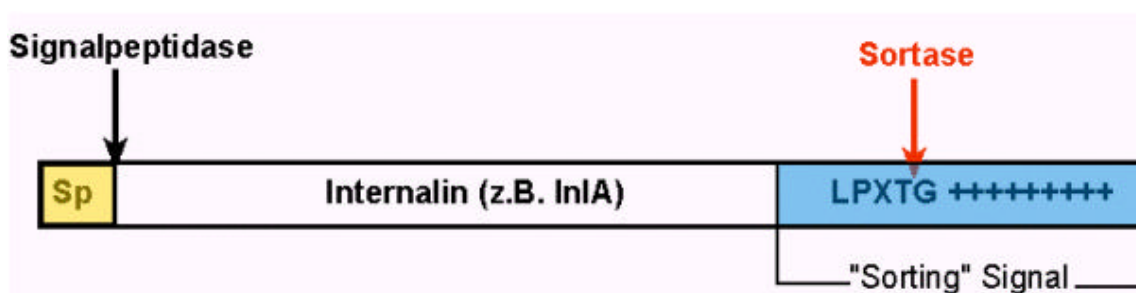
Da während des praktischen Teils dieser Arbeit vom Institut für Medizinische Mikrobiologie ein gemeinsames, EU-weites Projekt mit deutschen, französischen und spanischen Gruppen initiiert wurde, um das Genom von *L. monocytogenes* EGD-e zu sequenzieren, wurde auch in dieser Arbeit ein Beitrag hierzu geleistet. Um die erhaltenen DNA-Sequenzen aus dem Genomprojekt effizient und korrekt zusammenzusetzen, ist eine Kartierung des Genoms sehr hilfreich. Diese Kartierung sollte mit den Restriktionsenzymen NotI und AscI erfolgen. Deswegen wurden in dieser Arbeit verschiedene chromosomale Mutanten hergestellt, die in den bekannten Virulenzgenen NotI-Schnittstellen eingefügt bekamen, um diese Virulenzgene zu kartieren und zu lokalisieren. Insbesondere handelt es sich hierbei um NotI-Mutationen im *inlFDE*-Locus, im *inlAB*-Operon und im Virulenzgencluster. So war es möglich, das *inlAB*-Operon, den *inlFDE*-Locus und das Virulenzgencluster auf einem 1.1 Mb großen NotI-Fragment zu lokalisieren, die Entfernung zueinander anzugeben und die Orientierung festzustellen. So konnte festgestellt werden, dass die Distanz zwischen *inlAB* und *inlFDE* 180 kb und zwischen *inlFDE* und dem Virulenzgencluster 60 kb beträgt (von Both, 1999).

Sowohl bei *inlAB* als auch bei *inlFDE* handelt es sich um einen Cluster von Genen, die physikalisch miteinander verbunden und unter *L. monocytogenes*-Stämmen stark konserviert sind (Dramsi et al., 1997; Poyart et al., 1996; Raffelsbauer et al., 1998). Die anderen Mitglieder aus der Familie dieser LRR-Proteine, *irpA/inlC* und *inlG*, liegen auf dem Chromosom verteilt als einzelne Gene vor (Domann et al., 1997; Dramsi et al., 1997; Engelbrecht et al., 1996; von Both et al., 1999; diese Arbeit). Die Analyse des *inlFDE*-Locus verschiedener *L. monocytogenes*-Stämme hat interessante Einblicke in die genetische Variabilität dieses Erregers ermöglicht. So besteht der in dieser Arbeit beschriebene Locus aus dem Stamm EGD-e, der für das Listerien-Genomprojekt verwendet wurde, aus den Genen *inlF*, D und E. Der gleiche Locus wurde von einem anderen EGD-Stamm parallel zu dieser Arbeit identisch beschrieben, allerdings wurden die Gene als *inlG*, H und E bezeichnet (Raffelsbauer et al., 1998). Somit ist *inlF=inlG*, *inlD=inlH* und *inlE=inlE*. Die Sequenz dieser beiden Stämme ist absolut identisch. Interessante Unterschiede haben sich aber bei einem anderen *L. monocytogenes*-Stamm finden lassen, bei denen die Gene dieses Locus als *inlC2*, D und E bezeichnet wurden (Dramsi et al., 1997). *InlC2* ist zu 52.4% identisch mit *InlF* und *InlD* zu 53.5% identisch mit *InlD* (diese Arbeit). Vergleicht man aber die erste Hälfte des *InlC2*-Genproduktes mit der ersten Hälfte des *InlD*-Genproduktes (diese Arbeit), findet man erstaunlicherweise unter beiden Genen eine Identität von ca. 98%. Obwohl das *InlD*-Protein (diese Arbeit) 98% Identität und die gleiche Größe wie *InlC2* (Dramsi et al., 1997) hat, sind die beiden Proteine am C-Terminus doch unterschiedlich. Merkwürdigerweise ist dieser Teil des *InlD*-Proteins (außer 2 Aminosäuren an den Positionen 415 und 487, siehe Abb. 25) identisch mit dem C-Terminus des beschriebenen *InlD*-Proteins (Dramsi et al., 1997). Das *InlD*-Protein dieser Arbeit und das *InlD*-Protein von Dramsi et al. (1997) sind zu 53,5 % identisch. Offensichtlich gab es einmal einen Vorläuferstamm, dessen Locus an dieser Stelle aus vier *inl*-Genen bestand und die durch Rekombinationsereignisse neu



Vergleicht man die Genprodukte InlF, D, E und G mit den anderen bekannten LRR-Proteinen von *L. monocytogenes*, fallen einige gemeinsame Merkmale auf: Die Moleküle verfügen über ein Signalpeptid, das durch einen etwa 50 Aminosäuren großen Spacer von den Leucin-reichen Repeats getrennt wird. Diese Repeats sind -bis auf einzelne Ausnahmen- immer 22 Aminosäuren lang, aber in unterschiedlicher Anzahl vorhanden (InlA 16x, InlB 7x, IrpA/InlC 6x, InlF 6x, InlD 8x, InlE 8x, InlG 14x). Gefolgt werden diese LRR von einer unterschiedlich langen Aminosäuresequenz, an die sich, bis auf InlB und IrpA/InlC, eine weitere Repeatregion anschließt, gefolgt von einem Membrananker. Wahrscheinlich werden die neu identifizierten Internalinproteine F, D, E und G auf ähnliche Art und Weise in der Zellwand verankert, wie dies für das InternalinA und das Staphylokokken-Protein A beschrieben wurde (Schneewind et al., 1992; Dhar et al., 2000; Navarre et Schneewind, 1994). Auf

Grund von Sequenzanalysen ist davon auszugehen, dass die InlF/D/E/G-Proteine durch das Signalpeptid zur bakteriellen Oberfläche transportiert werden und, nachdem das Signalpeptid durch eine Signalpeptidase abgespalten wurde, an der Membran durch ihre hydrophoben Regionen des C-Terminus (auch „sorting“-Signal genannt) zurückgehalten werden. Dies wurde auch mit Hilfe des Computerprogramms TMHMM<sup>1</sup> („TransMembran Hidden Markov Model“; Sonnhamm et al., 1998) (V. 2.0) vom CBS (Centre of Biological Sequence Analysis) analysiert. Eine unbekannte, als Transpeptidase (Sortase) bezeichnete Enzymmaschinerie erkennt vermutlich das LPXTG-Motiv bei InlF und D und das LPTAG-Motiv von InlE, spaltet die Polypeptidkette zwischen Threonin (T) und Glycin (G) (bei InlF und InlD) bzw. die Polypeptidkette zwischen Alanin (A) und Glycin (G) (im Fall von InlE) und verbindet das COOH-Ende des Threonin bzw. des Alanin mit einer freien NH<sub>3</sub>-Gruppe der meso-Diaminopimelinsäure der Peptidoglykanschicht (Lebrun et al., 1996).



**Abb.49:** Allgemeine schematische Darstellung der Struktur der verschiedenen Internaline, die über einen Zellwandanker verfügen. SP = Signalpeptid; LPXTG = Zellwandanker-Motiv

Bemerkenswert sind die LRR in diesen Molekülen und man findet nur ganz wenige Beispiele von ähnlichen Molekülen unter pathogenen Bakterien, wie das YopM von *Yersinia pestis* und IpaH von *Shigella flexneri* (Leung et al., 1989; 1990), das TpLRR aus *Treponema pallidum* (Shevchenko et al., 1997), das filamentöse Hämagglutinin von *Bordetella pertussis* und das 98-kDa BspA-Protein von *Bacteroides forsythus* (BspA besteht aus 14 Wiederholungen „repeats“ von 23 Aa. Länge), das partiell Homologien zu Leucin-reichen Wiederholungen zeigt (Sharma et al., 1998). *Shigella flexneri*, dessen intrazellulärer Lebensstil eng mit *Listeria monocytogenes* verwandt ist, verfügt über mehrere Kopien von *ipaH* sowohl auf dem Chromosom als auch auf dem Virulenzplasmid (Buysse et al., 1987). Erst kürzlich gelang die Aufklärung der 3D-Struktur der ersten 242 Aminosäuren von InlB, die die LRR beinhalten (Marino et al., 1999). Hierdurch konnte klar gezeigt werden, dass die Leucine (oder seltener auch andere hydrophobe Aminosäuren wie Isoleucin und Valin) das „Rückgrat“ der Leucin-reichen Repeats bilden und innen liegen, während die anderen Aminosäuren nach außen zeigen und für Wechselwirkungen zur Verfügung stehen (Marino et al., 2000). Durch diese Strukturaufklärung und den Vergleich der LRR der anderen Internalin-Moleküle konnte ein Rahmen entworfen werden, in den sich die in dieser Arbeit beschriebenen Genprodukte

<sup>1</sup> Verfügbar unter: [www.cbs.dtu.dk/services/](http://www.cbs.dtu.dk/services/)



InIF, D, E und G einfassen lassen. So besteht ein 22 Aminosäuren langer LRR aus einem  $\beta$ -Faltblatt, was die konkave Seite bildet und einer  $3_{10}$ -Helix, die die konvexe Seite des Repeats repräsentiert. So kann angenommen werden, dass die Auswahl der nach außen gerichteten Aminosäuren und die Anzahl der LRR einen erheblichen Einfluss auf die Wechselwirkungen mit anderen Molekülen, z. B. Rezeptoren der Wirtszelle ausüben und so das Spektrum suszeptibler Wirtszellen beeinflusst.

LRR sind in der Regel kurze Sequenzmotive von 20 bis 29 Aminosäuren, die in über 60 verschiedenen Proteinen, meistens eukaryotischen, gefunden wurden. Die meisten von diesen sind in Protein-Protein-Interaktionen involviert, wie Signaltransduktion, Transkription und RNA-Prozessierung, DNA-Reparatur, Zelladhäsion, Rekombination, Embryonalentwicklung usw. Die Entstehung der LRR-Proteine innerhalb *L. monocytogenes* könnte eukaryotischen Ursprungs sein. D. h., dass Listerien Fremd-DNA aus eukaryotischen Zellen erworben und diese in ihr eigenes Genom eingebaut haben. Ein fast identischer LRR mit den LRR der Internaline wurde kürzlich bei der Rab Geranylgeranyltransferase beschrieben, die das Anhängen zweier Geranylgeranyl-Gruppen an den C-terminalen Cystein-Rest des Rab-Proteins katalysiert (Zhang et al., 2000).

Die Internaline sind offensichtlich nicht die einzigen Proteine in *L. monocytogenes*, die Module aus eukaryotischen Proteinen übernommen und mit bakteriellen Proteinmodulen kombiniert haben um diese „neuen“ Moleküle für eigene Zwecke zu verwenden. Ein weiteres sehr gutes Beispiel hierfür ist das *actA*-Gen, das für die Motilität von *Listeria monocytogenes* innerhalb eukaryotischer Zellen notwendig ist. Das *actA*-Gen ist ein einzigartiges Gen, das nirgendwo im bakteriellen Reich wieder zu finden ist. Homologe Proteine sind Zyxin und Vinculin, die in der Bildung des Aktincytoskeletts der eukaryotischen Zelle maßgeblich beteiligt sind. Wie ActA binden sie VASP und Mena und können daher als ActA-analoge Proteine der Wirtszelle angesehen werden und bieten eine Erklärung dafür, dass ein bakterielles Protein wie das ActA durch "Einverleiben" eines eukaryotischen Proteinbindungsmotivs die entsprechenden Bindungspartner in der infizierten Wirtszelle, in diesem Fall VASP und Mena, sehr effektiv rekrutieren kann. Ein weiteres Motiv findet sich am N-Terminus von ActA, das den Arp2/3-Komplex binden kann und zu einer effizienten Bildung von Aktinschweif führt (Chakraborty, 1996). Eine derartige Reorganisation und Rekrutierung von Cytoskelettelementen auf der Bakterienoberfläche schafft für pathogene Listerien die Voraussetzung, sich innerhalb der infizierten Wirtszelle fortzubewegen. Dieser Vorgang stellt ein exzellentes Beispiel für ein molekulares Mimikry dar, und die Aufklärung der molekularen Mechanismen der intrazellulären Listerienbewegung wird mit Sicherheit wesentlich zu unserem Verständnis komplexer Zellfunktionen wie der Zellbewegung beitragen.

Ein weitere Beispiel, was eventuell auf einen Gentransfer von Eukaryoten auf Listerien hindeutet ist eine „PEST-(P: Pro; E: Glu; S: Ser; T: Thr)-like“ Sequenz am N-Terminus des Listeriolysins (LLO). Diese PEST-ähnliche Sequenzen wurde bereits bei Eukaryoten-Proteinen gefunden und haben wichtige Funktionen in der Phosphorylierung und/oder dem proteolytischen Abbau der so markierten Moleküle bzw. in Protein-Protein-Interaktionen (Rogers et al., 1986; Rechsteiner et Rogers, 1996).

Diese „PEST-like“ Sequenz von LLO übt wahrscheinlich die gleiche Funktion aus, d.h., Listeriolysin wird von der Wirtszelle abgebaut und ist somit nur in der Vakuole aktiv und kann im Zytoplasma keinen Schaden anrichten (Decatur et Portnoy, 2000).

An diesem Punkt stellt sich die Frage, wie es *L. monocytogenes* geschafft hat, solche Mosaikgene oder Modulproteine aufzubauen und wie es möglich war (oder noch immer ist) Fremd-DNA zu erwerben und „Virulenzgencluster“ oder „Pathogenitätsinseln“ zu installieren. Hier sind verschiedene Mechanismen wie Konjugation, Transformation und Transduktion vorstellbar. Ein sehr beliebter Mechanismus zur Weitergabe genetischer Informationen ist die Konjugation, die vor allem durch die Verbreitung von Antibiotikaresistenzgenen unter gramnegativen und grampositiven Bakterien bekannt geworden ist. Ähnliche Mechanismen wurden auch für Listerien beschrieben, die solche Plasmide sogar unter Überwindung der Artgrenzen zwischen Enterokokken, Streptokokken und Staphylokokken ausgetauscht und so neue genetische Informationen erworben und/oder weitergegeben haben (Poyart-Salmeron et al., 1990).

Die andere Möglichkeit ist die natürliche Fähigkeit der Transformation, die auch als Kompetenz bezeichnet wird. Gut beschrieben sind diese Mechanismen z.B. bei *Bacillus* und *Pneumokokken* (Tortosa et Dubnau, 1999). Hierfür sind sogenannte Kompetenzgene verantwortlich, die die Aufnahme von Fremd-DNA erlauben. Allerdings gehören Arten aus der Gattung *Listeria* nicht in diese Gruppe der Bakterien mit natürlicher Kompetenz. Das muss aber nicht heißen, dass die Bakterien diese Fähigkeit zur Kompetenz früher auch nicht besaßen. Es ist möglich, dass Listerien diese Fähigkeit besaßen und im Laufe der Evolution durch Mutationen verloren haben. Nahrung erhält diese Hypothese durch das kürzlich abgeschlossene Genomprojekt von *L. monocytogenes*, in dem gezeigt werden konnte, dass das Genom dieses Erregers eine unerwartet hohe Synteny mit den Genomen von *Bacillus subtilis* und *Staphylococcus aureus* besitzt. Es konnten auch putative DNA-Aufnahmegene mit Homologien zu den Kompetenzgenen von *B. subtilis* gefunden werden (Domann, persönliche Mitteilung; Glaser et al., 2001). Beispiele hierfür sind bestimmte Gene, die *L. monocytogenes* als Virulenzfaktoren verwendet: Eine Metalloprotease, das Listeriolysin und verschiedene Phospholipasen, die mit signifikant hoher Homologie bei anderen grampositiven Bakterien wie *Bacillus*, *Clostridium* und *Streptococcus* gefunden wurden. Die beiden ersten Gattungen sind auch häufig im Boden oder auf Pflanzenmaterial zu finden! Eukaryontische Gene oder Genfragmente könnten die Listerien ursprünglich von Amöben erworben haben, die im Boden leben und Bakterien, wie z. B. Listerien, fressen. So kann man spekulieren, dass sich der Wirtszellzyklus in Amöben entwickelt und sich später bei der Infektion von Säugern als vorteilhaft erwiesen hat.

Nicht zu vergessen ist die Transduktion, bei der genetische Informationen durch die Infektion mit Bakteriophagen erworben werden. So konnten in Listerien lysogene (und auch rudimentäre) Phagen gefunden werden, die durch geeignete Signale freigesetzt werden können (Lössner et al., 2000). Genomanalysen des Virulenzgenclusters im Bereich der Haushaltsgene *prs* und *ldh* von *L.*

*monocytogenes* und anderen pathogenen und apathogenen Listerien haben Hinweise darauf erbracht, dass Phagen eine große Bedeutung bei der evolutiven Entwicklung von Listerien gespielt haben (Chakraborty et al., 2000). Nach dem Erwerb neuer genetischer Informationen, was sicherlich nur einige wenige Quantensprünge gewesen sein mögen, haben die Listerien diese im Chromosom verankert und später sind durch homologe Rekombinationen und Genfusionen neue Gene mit möglicherweise neuen Funktionen entstanden (siehe *inlFDE*-Locus bei mindestens zwei verschiedenen Stämmen). In diesem Zusammenhang ist auch wichtig zu erwähnen, dass alle Pathogenitätsfaktoren von *L. monocytogenes* chromosomal kodiert sind und nicht auf Plasmiden liegen, wie dies z. B. bei Shigellen und Salmonellen der Fall ist.

Da das am 3'-Ende des *inlFDE*-Clusters liegende Gen *dapE* signifikante Homologien zu Succinyldiaminopimelat-Desuccinylasen verschiedener Bakterien wie *E. coli* und *B. subtilis* aufwies, die an der Zellwandsynthese beteiligt sind, sollte eine chromosomale Deletion dieses Gens in *L. monocytogenes* zur Herstellung eines „Laborsicherheitsstammes“ erzeugt werden. Die Wahl fiel auf das *dapE*-Gen, weil durch Veröffentlichungen, wie z.B. Karita et al. (1997), bekannt ist, dass sich attenuierte *dapE*-Mutanten als Laborsicherheitsstämme eignen. Succinyldiaminopimlate Desuccinylase katalysiert die Hydrolyse der N-Succinyl-L-Diaminopimelinsäure zu L-Diaminopimelinsäure (L-DAP) und Succinat. L-DAP ist der Vorläufer von meso-DAP, ein sehr wichtiger Bestandteil fast aller Bakterienzellwände. Wenn das Gen oder dessen Genprodukt aus irgendeinem Grund nicht mehr funktionstüchtig ist, können die Bakterien nicht mehr überleben, weil sie nicht mehr in der Lage sind, die entsprechende Zellwand herzustellen: d.h., eine Mutation ist letal. Solche mutierten Bakterien (Auxotrophe) können jedoch überleben, wenn L-Diaminopimelinsäure (L-DAP) als Substrat zur Verfügung steht. Trotz einer erfolgreich durchgeführten Deletion des *dapE*-Genes (siehe Abb. 39), ist es nicht gelungen, die erwartete auxotrophe *dapE*-Mutante herzustellen. Die hergestellte  $\Delta$ *dapE*-Mutante war nicht vom Wildtyp zu unterscheiden. *L. monocytogenes* EGD-e verfügt möglicherweise über weitere solcher Gene bzw. andere Wege zur Synthese von DAP (Diaminopimelat).

Eine wichtige Fragestellung in der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung der Expression des *inlFDE*-Locus. Es sollte geklärt werden, unter welchen Bedingungen die Gene dieses Locus transkribiert werden und wie möglicherweise deren Regulation aussieht. Aufgrund der Klonierung und Sequenzierung des gesamten Locus konnte in dieser Arbeit mittels bioinformatischer Analysen gezeigt werden, dass alle drei Gene, *inlF*, *D*, *E*, über einen Terminator verfügen und keine bekannte PrfA-Box besitzen. Dies impliziert monocistronische Transkripte, sofern es in diesem Genomabschnitt nicht zu Antitermination kommt. Untersucht wurden daher die Gene *inlF*, *D*, *E* und *G* mit spezifischen Sonden. Obwohl die Bakterien bei drei verschiedenen Temperaturen (4°C: Kühlschranktemperaturen, 20°C: Umwelttemperatur, 37°C: Körpertemperatur) angezüchtet

wurden, konnte nur beim *inlD*-Gen ein Transkript, in diesem Fall ein monocistronisches mit der kalkulierten Größe von 1.65 kb, nachgewiesen werden. Dieses wurde konstitutiv exprimiert und war bei allen drei Temperaturen in der gleichen Größe nachweisbar. Bei allen anderen untersuchten Genen, *inlF*, E und G, konnte kein Transkript nachgewiesen werden. Offensichtlich war es unter den untersuchten Bedingungen nicht möglich, die Expression der Gene *inlF*, E und G zu induzieren. Hier sind eine Reihe von Faktoren, wie Sauerstoffpartialdruck, pH-Wert, Osmolarität, Ionenkonzentrationen und auch Regulationsfaktoren denkbar, die die Expression beeinflussen und steuern können. Die erhaltenen Ergebnisse decken sich, bis auf das *inlD*-Gen, mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen, die ebenfalls keine Transkripte nachweisen konnten (Dramsi et al., 1997, Raffelsbauer et al., 1998).

Da die Möglichkeit bestand, dass die mRNA der Gene *inlF*, E und G sehr instabil ist oder in zu geringen Mengen vorliegt, um im Northern-Blot nachgewiesen zu werden, wurde ein Reporter-gen-Assay zur Untersuchung der Promotoraktivitäten herangezogen. Hierfür wurde ein Schaukel-Vektor mit der Bezeichnung pSOG13 verwendet, der von Sonia Otten (Institut für Med. Mikrobiologie, Giessen) in ihrer Doktorarbeit hergestellt wurde. Es handelt sich um einen Expressionsvektor zur Untersuchung von Promotoraktivitäten, der eine objektive Bewertung der Aktivität durch Messung zulässt. Das Plasmid pSOG13 enthält als Reportergen die  $\beta$ -Galaktosidase (thermostabil) aus *Bacillus stearothermophilus*, vor das das zu untersuchende DNA-Fragment kloniert werden kann. Der Vorteil dieses Versuches ist, dass er die Durchführung der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitätsmessung bei einer hohen Temperatur (55-60°C) erlaubt, in dem alle andere  $\beta$ -Galaktosidasen des Wirtes inaktiv sind. Die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität ist durch standardisierte Hydrolyse eines Galaktosidase-spezifischen Substrates, das nach Spaltung einen gelben Farbumschlag aufweist, nachweisbar. Es handelt sich um das farblose o-Nitrophenyl- $\beta$ -D-Glycopyranosid, dessen Hydrolyseprodukt o-Nitrophenol gelb ist. Es wurden die Promotoren der Gene *inlF*, D, E und G untersucht. Es handelte sich dabei um transformierte *L. monocytogenes* Stämme, die in BHI bei 37°C angezüchtet wurden. Eine Lyse der Zellen erfolgte unter Anwendung eines Phagenlysins, das von Martin Lössner zur Verfügung gestellt und eine rasche Lyse der Listerien erlaubt. Als „Positivkontrolle“ wurde der starke Promotor des Listeriolysins verwendet und als „Negativkontrolle“ der des *bglA*-Gens (Darbouche, 1996). Auch in diesem System konnte nur beim *inlD*-Gen, wie schon bei den Northernblots gezeigt, eine Promotoraktivität nachgewiesen werden. Bei den anderen zu untersuchenden Genen war auch hier keine Aktivität nachweisbar. Die „Positivkontrolle“, der Promotor des *hly*-Gens, zeigte eine starke Aktivität, während die Aktivität des *inlD*-Promotors zwar vorhanden, aber vergleichsweise schwach war. Dies könnte daran liegen, dass der *hly*-Promotor sehr stark PrfA-reguliert ist und bei 37°C viel Transkript gebildet wird. Auch im Northern-Blot ist zu sehen, dass das *hly*-Transkript in größerer Menge vorhanden ist als das *inlD*-Transkript. Die geringere Aktivität des *inlD*-Promotors könnte darauf zurückzuführen sein, dass der für die Expression erforderliche Regulator in diesem System „ausverdünnt“ wird. Die Kopienzahl von

pSOG13 liegt bei ca. 50-100 pro Zelle. Das in der Arbeit von Raffelsbauer et al. (1998) verwendete GFP-Reportersystem erbrachte keine eindeutigen Ergebnisse hinsichtlich der Promotoraktivitäten.

Die oben beschriebenen Untersuchungen, eigene und die anderer Arbeitsgruppen, werfen die Frage auf, ob die verwendeten „künstlichen“ Systeme in diesem Fall ausreichend sind, um Transkription der Gene *inlF*, *D*, *E* und *G* nachzuweisen und zu untersuchen. Es kann angenommen werden, dass *L. monocytogenes* diese Gene nicht umsonst erhalten hat und dass sie eine Funktion haben müssen, wenn sie in dieser pathogenen Spezies vorhanden sind. Um der Funktion dieser Gene auf die Spur zu kommen und festzustellen, ob es sich um Pathogenitätsfaktoren handelt, wurden isogene chromosomale Deletionsmutanten in den Genen *inlF*, *inlD*, *inlE* und im gesamten Cluster *inlFDE* hergestellt. Diese Mutanten wurden anschließend in Zellkultursystemen und im Mausinfektionsmodell getestet.

Als Wirtszellen wurden die InlA-abhängigen Caco-2 Zellen und die InlB-abhängigen HeLa-Zellen ausgewählt und die Kriterien Invasion, Vordringen ins Cytoplasma, Aktinakkumulation und intrazelluläre Motilität und Ausbreitung von Zelle zu Zelle beurteilt. Bei allen verwendeten Mutanten konnte kein sichtbarer Unterschied zum Wildtyp festgestellt werden. Sie verhielten sich in der Invasion wie der Wildtyp und mikroskopisch war der Infektionszyklus in den Wirtszellen auch nicht von dem des Wildtyps zu unterscheiden. Dies bedeutet, dass die Genprodukte nicht an der Invasion in Caco-2 und HeLa-Zellen beteiligt sind, wie dies vielleicht aufgrund ihrer Struktur und Homologie zu den Internalinen zu erwarten gewesen wäre. Die gleichen Ergebnisse wurden von anderen Arbeitsgruppen auch für diese Zelllinien und für weitere Wirtszellen, wie HepG2, TIB 73 und S180 Fibroblasten, erzielt (Drams et al., 1997; Raffelsbauer et al., 1998). Aufgrund dieser Untersuchungen war auch phänotypisch kein Hinweis auf eine Funktion im Infektionszyklus zu finden. Überraschende Daten konnten dafür allerdings im Mausinfektionsmodell gewonnen werden. Für die Untersuchung von Listerienmutanten im Mausinfektionsmodell gibt es prinzipiell zwei Methoden: Erstens die Bestimmung der LD<sub>50</sub> und zweitens die Bestimmung der Zellzahl in bestimmten Organen, in der Regel in der Milz und in der Leber. In dieser Arbeit wurden die Bakterienzellzahlen (Kolonie-bildende Einheiten) aus Leber und Milz bestimmt. Hierzu wurden Balb/c-Mäuse intravenös mit dem Wildtyp, mit der  $\Delta inlD$ - und der  $\Delta inlFDE$ -Mutante infiziert und die Kolonie-bildenden Einheiten aus Leber und Milz nach drei Tagen bestimmt. Die  $\Delta inlD$ -Mutante wurde gewählt, weil *inlD* das einzige Gen aus diesem Locus war, bei dem Transkription nachgewiesen wurde und um so die Zahl der zu opfernden Mäuse gering zu halten. Die  $\Delta inlFDE$ -Mutante wurde verwendet, um mögliche weitere Effekte, bedingt durch *inlFE*, zu entdecken. Die Ergebnisse, die von Herrn Darji an der GBF in Braunschweig erzielt wurden, zeigen eine klare Attenuation der beiden Mutanten  $\Delta inlD$  und  $\Delta inlFDE$ . Es kann daher festgestellt werden, dass diese Ergebnisse die ersten Hinweise auf eine Rolle, zumindest von *inlD*, in der Pathogenität von *Listeria monocytogenes* darstellen. Ähnliche

Ergebnisse wurden auch von Raffelsbauer et al. (1998) erzielt, die sogar LD<sub>50</sub> Versuche an Mäusen (C57Bl6) durchgeführt haben und ebenfalls signifikante Attenuation feststellten. Erwähnenswert ist in diesem Zusammenhang, dass dieser Effekt unabhängig von der Art der Applikation erzielt wurde: oral (Raffelsbauer et al., 1998) und i.v. (diese Arbeit). Allerdings ist durch diese Untersuchungen noch nicht geklärt, welche Rolle InlD *in vivo* spielt. Dies müsste Gegenstand weiterer Untersuchungen sein. In einer von Appelberg et Leal (2000) durchgeführten Studien wurden defekte *actA*-, *plcB*- und *inlA*- und *inlB*-Gene von *L. monocytogenes* im Maus-Modell getestet. Die verschiedenen Mutanten waren weniger virulent, wenn sie intravenös in BALB/c-Mäuse eingespritzt wurden. Das Wachstum der verschiedenen Mutanten sowie des Wild-Typs wurde durch das Behandeln der Mäuse mit einem Neutrophil-spezifischen monoklonalen Antikörper RB6-8C5 gefördert. Die histologischen Untersuchungen der Leberorgane mit RB6-8C5 behandelten Tiere, zeigte in allen Fällen eine erhöhte intrahepatocytische Verbreitung der Listerien. Durch diese Daten wurde gezeigt, dass *L. monocytogenes* über mehrere Strategien verfügt, um in parenchymale Zellen einzudringen. Das Maus-Modell ist allerdings nicht immer der beste Weg, um die Pathogenität von *Listeria monocytogenes* zu untersuchen. Vor kurzem wurde gezeigt, dass InlA nur mit Human- bzw. Meerschweinchen-E-Cadherin interagieren kann. Die Interaktion mit dem Murine-E-Cadherin ist ausgeschlossen (Lecuit et al., 2001). Deswegen wird davon ausgegangen, dass das Mausmodell möglicherweise nicht geeignet ist, die Funktionen der anderen Internaline *in vivo* zu untersuchen. Da bis jetzt alle bekannten Virulenzgene von *L. monocytogenes* durch PrfA reguliert waren, ist der Virulenzeffekt von *inlD* bzw. des gesamten *inlFDE*-Locus im Maus-Modell ein überraschendes Ergebnis. Die Expression von *inlA* und *inlB* ist teilweise PrfA-abhängig, andererseits weiß man, dass die zwei PrfA-unabhängigen Promotoren von *inlA*-Gen für die Expression der beide *inlA* und *inlB* in extrazellulären Bedingungen wichtig sind (Lingnau et al., 1995; Dramsi et al., 1993). Letzteres könnte auch für die neuen *inlFDE*-Gene gelten. Starke PrfA-Abhängigkeit aber wurde besonders bei Virulenzgenen, deren Produkte für die intrazelluläre Replikation erforderlich sind, beobachtet (Kuhn und Goebel, 1995).

Um die Genprodukte InlFDE genauer untersuchen und darstellen zu können, wurden diese Proteine mit Hilfe des Gluthation S-Transferase Systems rekombinant gereinigt. Derartige Systeme erlauben, Proteine in beliebigen Mengen und von hoher Reinheitsqualität zu gewinnen. Diese Moleküle können dann für die Herstellung von Antikörpern verwendet werden, als Kristalle gezüchtet und für die Strukturaufklärung eingesetzt werden oder aber in der Affinitätschromatographie für die Untersuchung von Molekül-Molekül-Wechselwirkungen verwendet werden.

Zur Herstellung von polyklonalen Antikörpern wurden mit Hilfe rekombinanter Techniken aus *E. coli* die Genprodukte InlF, D und E gereinigt. Dazu wurden die Gene ohne deren Signalpeptid mit spezifischen Oligonukleotiden, die über eingebaute Restriktionsschnittstellen verfügten, aus chromosomaler DNA durch PCR amplifiziert und in den Expressionsvektor pGEX-6P-1

(Amersham Pharmacia Biotech) kloniert. Eine effiziente Überexpression der „in frame“ klonierten *inl*-Gene wird durch den *tac*-Promotor gewährleistet, welcher gezielt durch die Zugabe von IPTG angeschaltet und ansonsten durch den *lac*-Repressor blockiert wird. Die Genprodukte konnten in diesem System exprimiert und bis zur Homogenität gereinigt werden. Die Molekulargewichte der gereinigten Proteine in den SDS-Gelen stimmen, außer bei InlD, nicht mit den kalkulierten Molekulargewichten überein. Eine Sequenzierung der Klone ließ aber keine Abweichungen von der Sequenz erkennen. Solche Beobachtungen wurden bereits schon bei anderen listeriellen Proteinen gemacht. Hier sind vor allem die beiden Proteine ActA und Iap/P60 zu nennen, die auch über Repeatregionen verfügen und in der SDS-PAGE ebenfalls größer erscheinen als sie laut ihrer Aminosäuresequenz sein müssten.

Die drei Internalinproteine InlF, InlD, und InlE wurden aus *E. coli* (BL21) über Affinitäts-Chromatographie mit Glutathion Sepharose 4B als spezifisches Substrat in größeren Mengen aufgereinigt. Die Spaltung des fusionierten Proteins von dem an Glutathion Sepharose gekoppeltem GST erfolgte über eine spezifische Protease. Anschließend wurden mit diesen Proteinen Kaninchen immunisiert und polyklonale Antikörper hergestellt. Diese polyklonalen Antikörper wurden auf Listerien-Zellwand- bzw. -Überstandsproteine getestet. Da InlF und InlE in der mRNA-Studie kein Transkript zeigten, war keine Bindungsreaktion mit dem entsprechenden Antikörper zu erwarten. Da es aber möglich war, dass die mRNA nur in sehr geringen Mengen vorhanden sein könnte (siehe oben) und sie auch sehr stabil sein könnte, wurden die Stämme trotzdem getestet. Im Fall von InlD war es wahrscheinlicher, dass eine Bindungsreaktion mit dem Antikörper (Anti-InlD) stattfand. Leider konnten diese Banden auf dem Blot nicht eindeutig identifiziert werden, da die Kaninchenserum gegen die Internaline InlF, D und E unspezifisch mit anderen Listerienproteinen reagierte. Da sich die verschiedenen Internaline über mehrere homologe Sequenzen ähneln, ist davon auszugehen, dass diese Antikörper auch mit anderen Internalinproteinen, wahrscheinlich über die Leucin-reichen Repeats, kreuzreagieren. So ein Fall ist z.B. auf der Abb. 36 zu sehen. In der linken Spalte, zweite Reihe, fehlt bei der  $\Delta inlFDEABC$ -Mutante die charakteristische Bande auf Höhe des InlA. Dies lässt vermuten, dass Anti-InlD auch InlA erkennt. Um die Genprodukte InlFDE im Immunoblot eindeutig zu detektieren, müssten monoklonale Antikörper hergestellt werden, die charakteristische Epitope erkennen.

Die Entdeckung der drei Internaline F, D, und E erhöht die Zahl der bekannten Internaline in *Listeria monocytogenes*. Nach bisherigen Ergebnissen sind die Internaline *L. monocytogenes* spezifisch, wobei es aber Stamm-spezifische Unterschiede gibt. Darum war es wichtig, sowohl die Variabilität als auch die Expression der Internaline in den verschiedenen Stämmen und ihre Wirkung auf verschiedene Zelllinien sowie ihre Beteiligung an der Virulenz an einem geeigneten Tiermodell zu testen.





## Regulation von InlAB

Der erste Schritt des Infektionszyklus von *L. monocytogenes* stellt die Adhäsion an und die Invasion von eukaryontischen Wirtszellen dar. Bisher wurde gezeigt, dass InlA und InlB für die Internalisation in nicht phagozytische Zelllinien erforderlich sind und spezifisch an Rezeptoren binden (Gaillard et al., 1991; Mengaud et al., 1996; Shen et al., 2000). RNA-Transkriptionsstudien zeigten, dass *inlA* und *inlB* sowohl poly- als auch monocistronisch transkribiert werden können (Lingnau et al., 1995). Dafür sind insgesamt 5 *inlAB*-Promotoren beschrieben. Nur ein einziges Promotormotiv scheint PrfA-abhängig reguliert zu sein (Lingnau et al., 1995). Dieser PrfA-abhängige Promotorbereich liegt 431 bp stromaufwärts von *inlA*, ist 14 bp groß und wurde als *PprfA*-Box des *inlAB*-Operons bezeichnet. Die *PprfA*-Boxen aller bekannten Virulenz-Gene, sowohl in *L. monocytogenes* als auch in *L. ivanovii*, sind als das Motiv TTAACNNNTGTTAN konserviert. Nur im Fall von *inlAB* wird das erste T durch ein A ersetzt und sieht wie folgt aus: **ATAACATAAGTTAA**.

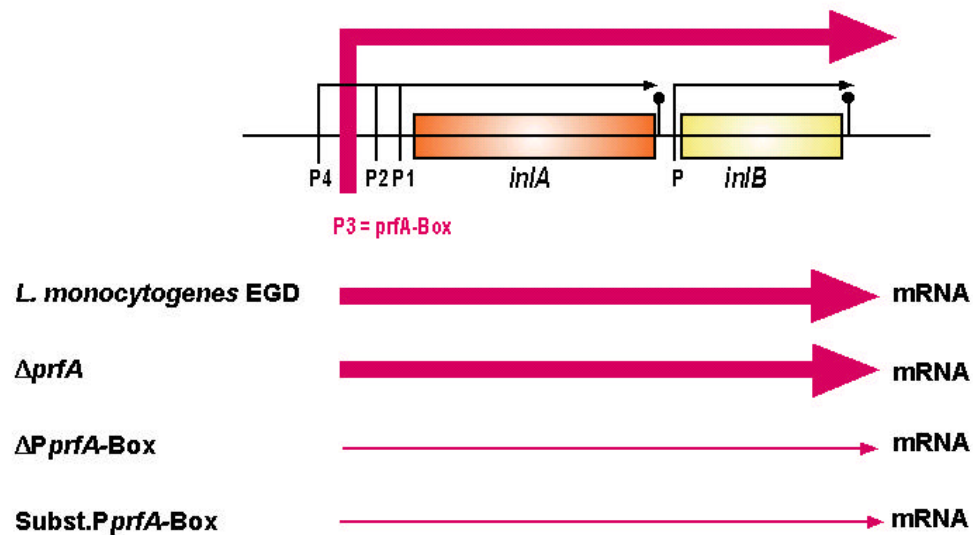
T T A A C A A A T G T T A G	<i>actA</i>
T T A A C A T T T G T T A A	<i>plcA</i>
T T A A C A A A T G T A A A	<i>hly</i>
T T A A C A A A T G T T A A	<i>mpl</i>
<b>A</b> T A A C A T A <b>A</b> G T T A A	<i>inlA</i>
T T A A C G C T T G T T A A	<i>irpA (inlC)</i>
T T A A C A A A T G T T A A	<i>ivanovii-actA</i>
T T A A C A A A T G T T A A	<i>ivanovii-plcA</i>
T T A A C A T T T G T T A A	<i>ivanovii-ilo</i>
T T A A C A A A T G T T A A	<i>ivanovii-mpl</i>
T T A A C G C T T G T T A A	<i>ivanovii-inlC</i>
T T A A C T T T T G T T A T	<i>ivanovii-inlD</i>
T T A A C A T T T G T T A A	<i>ivanovii-inlE</i>
T T A A C T T T T G T T A T	<i>ivanovii-inlF</i>

Das *inlAB*-Operon ist so organisiert, dass ein 5.000 Nukleotid großes Transkript nur unter PrfA-Regulation entsteht (*inlAB*-Polycistron), ansonsten werden *inlA* und *inlB* durch ihre einzelnen schwachen Promotoren transkribiert (*inlA* = 2.900 Nukleotide bzw. *inlB* = 1.900 Nukleotide). Die Bedeutung des PrfA-Proteins in der Regulation von Virulenzgenen in *L. monocytogenes* wurde durch eine Insertionsmutante in *prfA* festgestellt (Chakraborty et al., 1992). In einer Studie wurde die Wechselwirkung zwischen dem gereinigten PrfA-Transkriptionsfaktor und der *PprfA*-Box von *hly* und *inlA*, in Anwesenheit bzw. in Abwesenheit von Paf (*P*rfA-*a*ctivating factor), durchgeführt. Es wurde festgestellt, dass das PrfA-Protein unabhängig von Paf in der Lage ist, an der *PprfA*-Box zu binden. Gab man Paf allein in Abwesenheit von PrfA hinzu, kam es zu keiner signifikanten Proteinbindung an der *PprfA*-Box. Gab man danach Paf zu PrfA, wurde hingegen ein gemeinsamer

Komplex gebildet, der mit der *PprfA*-Box interagiert (Dickneite et al., 1998). Im Gegensatz zu *hly* bindet der Paf-Komplex an der *PprfA*-Box von *inlA*, ohne dass es zu einer Wechselwirkung mit PrfA kommt (Dickneite et al., 1998).

Diesem Teil der Arbeit lag folgende Überlegung zugrunde: Wenn PrfA fehlt, sollte es trotzdem zu einer Invasion suszeptibler Wirtszellen kommen, die aber aufgrund der geringeren Transkriptionsrate durch die PrfA-unabhängige Regulation niedriger ist. Es sollte beantwortet werden, wie sich verschiedene Mutationen auf die Regulation des Internalin-Operons auswirken: Was wäre, wenn man Mutationen bzw. Änderungen innerhalb der *PprfA*-Box verursacht? Wird PrfA immer noch als positiver Regulator wirken? Spielt die *PprfA*-Box wirklich die entscheidende Rolle bei der *inlAB*-Transkription? Ist die PrfA-abhängige Regulation für die Invasion notwendig? Zur Beantwortung dieser Fragen sollten neue chromosomale Mutanten hergestellt werden, denen zum einen die PrfA-Box fehlt und zum anderen die PrfA-Box substituiert wurde, um die Topologie der DNA nicht zu verändern.

Es ist bekannt, dass die Invasion von *Listeria monocytogenes* in HeLa-Zellen InlB-abhängig und in Caco-Zellen InlA-abhängig ist (Hain, 1998). Deswegen wurden in dieser Arbeit Zellinfektionsversuche mit HeLa- bzw. Caco-2 Zellen mit den Stämmen  $\Delta inlAB2$ ,  $\Delta prfA2$  und mit den geänderten *PprfA*-Boxen durchgeführt. Diese Versuche haben zu überraschenden Ergebnissen geführt. Bei der Analyse der mRNA im Northern-Blot war durch Hybridisierung mit DIG-markierten Sonden gegen *inlA* und *inlB* ein polycistronisches Transkript von ca. 4.800 Nukleotiden Länge sowohl bei dem Wildtyp EGD-e als auch bei der  $\Delta prfA2$  Deletionsmutante detektierbar. Dieses Transkript konnte jedoch bei den Mutanten  $\Delta inlAB2$ ,  $\Delta PprfA$ -Box und Subst.*PprfA*-Box nicht gefunden werden. Um eine Vorstellung von der Transkriptmenge zu bekommen, wurden DNA-RNA-Hybridisierungsstudien im Dotblot durchgeführt. 0.5 bis 25µg Gesamt-RNA des EGD-e-Wildtyps, der  $\Delta prfA2$ -, der  $\Delta inlAB2$ - und der  $\Delta$ - bzw. Subst.-*PprfA*-Box Mutante wurden dazu verwendet. Die Analyse der Transkriptmengen der *inlAB*-Gene im Dotblot ergab die gleichen Transkriptmengen beim Wildtyp EGD-e und bei der  $\Delta prfA2$  Mutante. Bei der  $\Delta inlAB2$  Mutante konnte kein Transkript festgestellt werden, da die Gene fehlen. Überraschenderweise waren bei den  $\Delta$ - bzw. Subst.-*PprfA*-Box-Mutanten nur schwache Transkripte zu detektieren. Dies bedeutet, dass die Transkription des *inlAB*-Operons überwiegend PrfA-unabhängig verläuft. Aber wird die PrfA-Box vor dem *inlAB*-Operon mutiert, findet praktisch keine Transkription mehr statt. Fazit ist, dass dieses Operon nicht von PrfA reguliert wird, sondern von einem anderen Regulator, der im Bereich der PrfA-Box bindet. Dieser unerwartete Befund ist in der folgenden Abbildung 50 dargestellt.



**Abb. 50:** Schematische Darstellung der Regulation des *inlAB*-Operons. Die Stärke der Pfeile soll das Verhältnis der Transkriptmengen demonstrieren.

Die Ergebnisse wurden bei der Analyse von Membranproteinen im Immunoblot mit monoklonalen Antikörpern gegen InlA und InlB bestätigt. Beim Wildtyp und bei der PrfA-defizienten Mutante war die gleiche Menge an InlA und InlB nachweisbar, während bei den beiden PrfA-Box Mutanten bei InlA und InlB nur geringe Proteinmengen detektierbar waren. D. h., die Proteinmengen spiegeln sich in den Transkriptmengen wider.

Auch die Infektionsversuche mit Caco-2 und HeLa Zellen erbrachten Überraschungen. Wie oben gezeigt werden konnte, verfügte die  $\Delta prfA$ -Mutante über die gleiche Menge an InlA und InlB wie der Wildtyp. Aber trotzdem lag die Invasionsrate bei Caco-2 und HeLa nur zwischen 0.1 und 1 %! Das gleiche Ergebnis wurde auch für die beiden PrfA-Box-Mutanten erzielt. Interessant bei der  $\Delta prfA$ -Mutante ist, dass die Invasionsrate trotz Anwesenheit der Internaline praktisch bei Null liegt. Dies bedeutet, dass andere, offensichtlich PrfA-regulierte Pathogenitätsfaktoren für eine effiziente Invasion notwendig sind. Hier spielen sicherlich das Listeriolysin, die beiden Phospholipasen PlcA und PlcB und eventuell auch ActA eine wichtige Rolle (Sibeliu et al., 1999 und 1996; Goldfine et al., 1997; Vazquez-Boland et al., 1992). Listeriolysin und PlcA sind in der Signaltransduktion beteiligt und bereiten die Zelle für die Invasion gewissermaßen vor. In seiner Doktorarbeit konnte Pashalidis (2001) zeigen, dass die apathogene Art *L. innocua*, transformiert mit dem *inlAB*-Operon, trotz großer Mengen an Internalinen auf der Oberfläche nicht zur effizienten Invasion in der Lage war. Auch dies spiegelt die Notwendigkeit weiterer Faktoren wider. Auf der anderen Seite sind die PrfA-regulierten Pathogenitätsfaktoren, wie LLO, PlcAB und ActA, in den beiden *prfA*-Box-Mutanten vorhanden, aber kaum Internalinproteine. Dies bedeutet, dass diese geringen Mengen ebenfalls nicht für eine effiziente Invasion ausreichen.

Als Schlussfolgerung wird festgestellt, dass PrfA nicht der Regulationsfaktor für das *InlAB*-Operon ist, für den er bisher gehalten wurde, sondern dass es einen weiteren, bisher unbekannten

Regulationsfaktor geben muss. Für die Invasion von *L. monocytogenes* sind auch andere PrfA-regulierte Faktoren notwendig. Diese Faktoren könnten LLO und PlcA/B sein, da sie auch eine wichtige Funktion in der Internalisation von *L. monocytogenes* haben.

Zu dem Zeitpunkt, als das Genomsequenzprojekt von *L. monocytogenes* fast beendet war, wurde deswegen mit PrfA eine Homologiesuche im Genom durchgeführt. Die Recherche hat zu der Entdeckung einer Proteinsequenz geführt, die zu der gleichen Regulatorfamilie von PrfA (CAP/FNR) geführt. Eine Deletion in diesem Gen zeigte aber keine Auswirkungen auf die *inlAB*-Transkription (Domann, persönliche Mitteilung).

Eine Möglichkeit, diesen *inlAB*-Regulator zu finden, wäre eine Transposonmutagenese mit Tn 916 bei *L. monocytogenes*  $\Delta prfA$ , in der die Selektion und gleichzeitig die Anreicherung von Transposonmutanten auf Antibiotika-haltigen Blutagarplatten stattfinden sollte, weil die  $\Delta prfA2$ -Mutante wegen der fehlenden PrfA-Regulation ahämolytisch ist. Alle Transposonmutanten werden anschließend in Mikrotiterplatten angezüchtet, die Überstände isoliert und präzipitiert und die ausgefällten Proteine in einem *InlA/B*-spezifischen ELISA überprüft. Alle Stämme, die negativ oder nur schwach positiv auffallen, werden zur weiteren Untersuchung herangezogen. Man kann bei dieser Methode vier verschiedene Typen von Mutanten erwarten: (1) Insertionen im *inlA*- oder *inlB*-Gen, (2) Insertionen im Promotorbereich des Internalin-Operons, (3) Insertionen im gesuchten Regulatorgen X und (4) Insertionen im Promotorbereich des Regulators X oder eventuell übergeordneter/untergeordneter Gene. Durch inverse PCR könnten die Tn 916-flankierenden Bereiche amplifiziert und sequenziert und anhand *L. monocytogenes*-Datenbanken verglichen werden. Weiterhin sollten durch Band-Shifts und BIAcore-Analysen die Bindungen der gereinigten Regulatoren PrfA und RegX an kurze DNA-Fragmente mit optimaler und mutierter Box untersucht werden.

*L. monocytogenes* ist ein „Überlebenskünstler“, der in der Natur weit verbreitet ist. Man findet diesen Keim im Erdboden, in Oberflächengewässern, auf Pflanzen, in Lebensmitteln, im Darmtrakt von Menschen und Tieren, aber auch intrazellulär. Als „Generalist“ verfügt dieses Bakterium über ein Set von Molekülen, um Wechselwirkungen zu ermöglichen, wie z.B. Anheftung an Oberflächen bzw. Penetration in Wirtszellen. Bisher sind zwei LRR-Proteine, die an der Anheftung dieses Keims an Wirtszellen beteiligt sind, bekannt. Es handelt sich um *InlA* und *InlB*. Eine weitere breite Palette von LRR-Proteinen, deren Funktion normalerweise für Protein-Protein-Interaktion involviert ist (Kobe et Deisenhofer, 1995), wurde identifiziert. Mensch- bzw. Tierpathogene *L. monocytogenes* unterscheiden sich von den anderen apathogenen Listerien (z.B. *L. innocua*) dadurch, dass *L. monocytogenes* über einige Pathogenitätsinseln bzw. Gene, die z.B. für seine Anheftung bzw. Invasion in Wirtszellen wichtig ist, verfügt. Solche Pathogenitätsinseln (PAIs) bzw. Gene kommen zum Teil bei anderen Stämmen entweder verändert oder gar nicht vor. Weitere Studien haben gezeigt, dass einige Stämme von *L. monocytogenes* aus Lebensmitteln sich von den anderen *L.*

*monocytogenes* dadurch unterscheiden, dass sie über eine „nonsens“-Mutation innerhalb des *inlA*-Gens verfügen. Diese Punkt-Mutationen haben sich z. B. im Membrananker von *inlA* manifestiert und führen zur Sezernierung dieses Proteins und damit zur Verminderung der Internalisation (Jonquieres et al., 1998).

Im natürlichen Habitat von Listerien sind Umweltfaktoren wie Temperatur, Salzgehalt, Sauerstoff- und Nährstoffkonzentration ständigen Schwankungen unterworfen. Die Überlebensfähigkeit dieser Keime hängt von ihrer Fähigkeit zur Anpassung an die veränderten Umweltbedingungen ab. Der grundlegende Mechanismus für diese Anpassung ist die Regulation der Genexpression. Ein Hauptproblem der Infektionsbiologie stellt sich jedoch durch die Regulation der Expression von Virulenzfaktoren. In vielen Fällen erfolgt die Expression als Reaktion auf im Wirtsorganismus vorliegende Stressfaktoren. Bemerkenswert ist dabei, dass bestimmte Stressfaktoren wie die Temperaturänderung sowohl Gene, die zur allgemeinen Stressantwort in pathogenen wie nichtpathogenen Bakterien gehören, als auch spezielle Virulenzgene aktivieren. Virulenzfaktoren werden fast niemals konstitutiv exprimiert, die Expression erfolgt meist genau reguliert unter den Bedingungen, bei denen die Expression für den Erreger sinnvoll ist. Unter anderem konnte gezeigt werden, dass die Expression bestimmter Virulenzgene bei *Vibrio cholerae* durch den Mucus des Darmepithels (Sanchez et al., 1995), bei *Yersinia* spp. durch Temperaturerhöhung von 25°C auf 37°C (Al-Hendy et al., 1991) oder bei *Salmonella typhimurium* durch Sauerstofflimitierung und hohe Osmolarität (Bajaj et al., 1996) induziert werden kann. In einigen Fällen kann durch die Wahl entsprechender Anzuchtbedingungen auch *in vitro* eine Expression bestimmter Virulenzfaktoren erzielt werden. Besonders hilfreich für die Analyse der Expression von Virulenzfaktoren sind dabei Experimente, bei denen das Verhalten von pathogenen Mikroorganismen unter Bedingungen, die den in natürlichen Habitaten herrschenden Verhältnissen nahe kommen, simuliert werden. Weiterhin sind Studien sinnvoll, die die Reaktion der Erreger nach Interaktion mit kultivierten eukaryotischen Zelllinien aufzeigen. Aus diesem Grunde ist es erforderlich, die Expression aller Gene von *Listeria monocytogenes* gleichzeitig untersuchen zu können. Veränderte Genexpression äußert sich in einer Veränderung der Zusammensetzung des bakteriellen mRNA- und Protein-Pools. Der Vorgang der Genexpression besteht aus einem "Umschreiben" der genetischen Information (Gene) in Botenmoleküle (mRNA, messengerRNA), gefolgt von der Übersetzung der Boteninformation in aktive Eiweiß-Moleküle (Proteine, Enzyme). Infolge der Änderung eines Umweltparameters kann sich die Expression einer Vielzahl von Genen gleichzeitig ändern. Die qualitative und quantitative Analyse der Gesamtheit der zellulären mRNA ist erst seit Einführung der DNA-Chip- bzw. Mikroarray-Technologie möglich. Auf einem Mikroarray (Größe 1 cm<sup>2</sup>) sind alle Gene eines Organismus in einer rasterförmigen Anordnung repräsentiert, so dass jedem Gen eine exakte Koordinatenposition zugeordnet werden kann. Da die Sequenzen aller Gene des Erregers *Listera*

*monocytogenes* bekannt sind<sup>2</sup>, setzt die Synthese der einzelnen Gene für die Konstruktion eines Mikroarrays voraus (Glaser et al., 2001). Für eine Mikroarray-Analyse werden die Moleküle des mRNA-Pools in cDNA-Moleküle umgeschrieben und die cDNA dabei gleichzeitig mit einem Fluoreszenz-Farbstoff markiert. Dann wird der Mikroarray mit dem cDNA-Gemisch in Kontakt gebracht. Jedes Gen auf dem Array bindet spezifisch nur eine cDNA-Art, nämlich diejenige, die seiner Abschrift (mRNA) entspricht. Fluoreszenz-Signale auf dem Array zeigen also an, welche Gene exprimiert worden sind, wobei die Signalintensität dem Ausmaß der Expression entspricht.

Ein andere Möglichkeit für die Interpretation von Genexpression innerhalb von *L. monocytogenes* besteht in der Analyse des Protein-Pools (Proteom) des Keimes. Die qualitative und quantitative Analyse der zellulären Proteine geschieht mit Hilfe der sogenannten "zweidimensionalen Gel-Elektrophorese". Diese Technik erlaubt, jede Protein-Art aus dem zellulären Protein-Pool als einzelnen Punkt auf einer Fläche von ca. 20cm x 25cm darzustellen. Durch spezielle Protein-Färbeverfahren ist es möglich, die separierten Proteine zu quantifizieren. Für die Identifizierung der einzelnen Protein-Arten sind im Anschluss daran weitere Schritte nötig. In einer enzymatischen Reaktion erzeugt man von jeder Protein-Art ein Gemisch spezifischer Spaltprodukte (Peptide), welches massenspektrometrisch analysiert wird. Die so gemessenen Peptid-Massen bilden den charakteristischen "Fingerabdruck" für jede Protein-Art. Identifiziert werden die Proteine schließlich, indem man die experimentell gemessenen Peptidmassen mit einer Liste von Peptidmassen vergleicht, die der Computer bei der theoretischen Spaltung aller Proteine des Organismus errechnet. Voraussetzung für diesen Vergleich ist, dass der Gesamtbestand der Proteine mit Hilfe bioinformatischer Methoden bereits aus der vollständigen genomischen Sequenz des Organismus abgeleitet wurde. Die Kenntnis der vollständigen genomischen Sequenz des Keimes stellt somit die Grundlage dar für die Analyse des Transkriptoms und des Proteoms. Moderne Sequenzierungsmethoden und -strategien versetzen die Forscher heute in die Lage, die vollständige genomische Sequenz eines Bakteriums in einem Zeitraum von wenigen Monaten zu ermitteln.

In der genomischen Sequenz müssen dann zunächst diejenigen Bereiche identifiziert werden, die Gene darstellen. Im Anschluss daran erfolgt eine theoretische Funktionszuweisung für die kodierten Proteine aufgrund der Sequenzähnlichkeit zu Proteinen mit bereits bekannter Funktion. Dabei bedient man sich einer Vielzahl bioinformatischer Methoden und umfangreicher Sequenz-Datenbanken. Der Prozess der Funktionszuweisung wird allgemein als "Annotation" bezeichnet. Ziel der Annotation ist es, das Gesamtpotential des Stoffwechsels eines Organismus einschätzen zu können. Diese theoretische Funktionszuweisung lässt sich durch Korrelation mit den Daten aus der funktionalen Genomanalyse überprüfen und ergänzen.

---

<sup>2</sup> Genomprojekt "European consortium" (01. 10. 1998 – 30. 09. 2000). Sequenzen verfügbar unter: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Taxonomy/wgetorg?id=1639&lvl=3>

Wichtig sind für den Erfolg solcher Untersuchungen die genetischen Methoden, Mutanten und Komplementanten herzustellen, um Funktionsstudien *in vitro* und *in vivo* durchführen zu können.

## 7. LITERATUR

1. **Adhya S., Gottesman M.** (1978): Control of transcription termination. *Ann. Rev. Biochem.*, **47** 967-996.
2. **Al-Hendy A., Toivanen P., Skurnik M.** (1991). The effect of growth temperature on the biosynthesis of *Yersinia enterocolitica* O:3 lipopolysaccharide: temperature regulates the transcription of the *rfb* but not of the *rfa* region. *Microb Pathog*; **10**(1):81-6
3. **Alvarez-Dominguez C., Vazquez-Boland JA, Carrasco-Marin E, Lopez-Mato P, Leyva-Cobian F.** (1997). Host cell heparan sulfate proteoglycans mediate attachment and entry of *Listeria monocytogenes*, and the listerial surface protein ActA is involved in heparan sulfate receptor recognition. *Infect Immun*; **65**(1):78-88
4. **Anderson W. F., Ohlendorf D. H., Takeda Y, Matthews B. W.** (1981) . Structure of the *cro* repressor from bacteriophage lambda and its interaction with DNA. *Nature*; **290**(5809):754-8
5. **Appelberg R, Leal I. S.** (2000). Mutants of *Listeria monocytogenes* defective in *In vitro* invasion and cell-to-cell spreading still invade and proliferate in hepatocytes of neutropenic mice. *Infect Immun*; **68**(2):912-4
6. **Bajaj V, Lucas RL, Hwang C, Lee CA.** (1996). Co-ordinate regulation of *Salmonella typhimurium* invasion genes by environmental and regulatory factors is mediated by control of *hlyA* expression. *Mol Microbiol*; **22**(4):703-14
7. **Bancroft G. J, Kelly J. P.** (1994). Macrophage activation and innate resistance to infection in SCID. *Mice.Immunobiology*; **191**(4-5):424-31. Review
8. **Bggv-Pressedienst (Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin).** (1999):“ Listerien-Infektion vermeiden“
9. **Bhat, K. S., C. P. Gibbs, O. Barrera, S. G. Morrison, F. Jähnig, A. Stern, E.-M. Kupsch, T. F. Meyer, and J. Swanson.** (1991). The opacity proteins of *Neisseria gonorrhoeae* strain MS11 are encoded by a family of 11 complete genes. *Mol. Microbiol.* **5**:1889-1901
10. **Bhat, K. S., C. P. Gibbs, O. Barrera, S. G. Morrison, F. Jähnig, A. Stern, E.-M. Kupsch, T. F. Meyer, and J. Swanson.** (1992). The opacity proteins of *Neisseria gonorrhoeae* strain MS11 are encoded by a family of 11 complete genes. *Mol. Microbiol.* **6**:1073-1076
11. **Birchmeier C, Gherardi E.** (1998). Developmental roles of HGF/SF and its receptor, the c-Met tyrosine kinase. *Trends Cell Biol*; **8**(10):4704-10
12. **Bille (J.), Rocourt (J.) et Swaminathan B** (1999). *Listeria, Erysipelothrix, and Kurthia*. In: P.R. Murray, E.J. Baron, M.A. Pfaller, F.C. Tenover et R.H. Tenover (ed.) : *Manual of Clinical Microbiology*, 7th edition, ASM Press, Washington, D.C, pp. 346-356
13. **Born TL, Zheng R, Blanchard JS.** (1998).Hydrolysis of N-succinyl-L,L-diaminopimelic acid by the *Haemophilus influenzae* *dapE*-encoded desuccinylase: metal activation, solvent isotope effects, and kinetic mechanism. *Biochemistry.* **37**(29):10478-87
14. **Bouvier J, Richaud C, Higgins W, Bogler O, Stragier P.** (1992). Cloning, characterization, and expression of the *dapE* gene of *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* **174**(16):5265-71
15. **Braun L., Dramsi S., Dehoux P., Bierne H., Lindahl G., Cossart P.** (1997). InlB: an invasion protein of *Listeria monocytogenes* with a novel type of surface association. *Mol. Microbiol* **25**(2): 285-294
16. **Braun L, Nato F, Payraastre B, Mazie JC, Cossart P.** (1999). The 213-amino-acid leucine-rich repeat region of the *listeria monocytogenes* InlB protein is sufficient for entry into mammalian cells, stimulation of PI 3-kinase and membrane ruffling. *Mol Microbiol*; **34**(1):10-23
17. **Braun L, Ghebrehiwet B, Cossart P.** (2000). gC1q-R/p32, a C1q-binding protein, is a receptor for the InlB invasion protein of *Listeria monocytogenes*. *EMBO J* ;**19**(7):1458-66
18. **Brunt L. M., Portnoy D. A., Unanue E. R.** (1990). Presentation of *Listeria monocytogenes* to CD8+ T cells requires secretion of hemolysin and intracellular bacterial growth.*J Immunol* **145** (11):3540-3546
19. **Bubert A, Riebe J, Schnitzler N, Schonberg A, Goebel W, Schubert P** (1997). Isolation of catalase-negative *Listeria monocytogenes* strains from listeriosis patients and their rapid identification by anti-p60 antibodies and/or PCR. *J Clin Microbiol*; **35**(1):179-83
20. **Bubert, A., Sokolovic, Z., Chun.S.K., Papatheodorou, L., Simm, A., Goebel, W.** (1999). Differential expression of *Listeria monocytogenes* virulence genes in mammalian host cells *Mol. Gen. Genet.* **261**, 323-336
21. **Buske, S.** (laufende Doktorarbeit). Institut für Medizinische Mikrobiologie, Justus-Liebig-Universität Giessen
22. **Buyse, J. M., C. K. Stover, E. V. oaks, M. Venkatesan, and D. J. Kopecko.** (1987).



- Molecular cloning of invasion plasmid antigen (*ipa*) genes from *Shigella Flexneri*: analysis of *ipa* gene products and genetic mapping. *J. Bacteriol.* **169**: 2561-2569
23. **Camilli A., Tilney L. G., Portnoy D. A.** (1993). Dual roles of *plcA* in *Listeria monocytogenes* pathogenesis. *Mol Microbiol* **8** (1): 143-157
  24. **Carmin Alvarez-Dominguez, José-Antonio Vazquez-Boland, Eugenio Carrasco-Marin, Paz Lopez-Mato, and Francisco Leyva-Cobian.** (1997). Host Cell Heparan Sulfate Proteoglycans Mediate Attachment and Entry of *Listeria monocytogenes*, and the Listerial Surface Protein ActA Is Involved in Heparan Sulfate Receptor Recognition. *Infec. Immun.* **65**: 78-88
  25. **Chakraborty T** (1996) The molecular mechanisms of actin-based intracellular motility by *Listeria monocytogenes*. *Microbiologia SEM* **12**:237-244
  26. **Chakraborty T, Leimeister-Wachter M, Domann E, Hartl M, Goebel W, Nichterlein T, Notermans S.** (1992). Coordinate regulation of virulence genes in *Listeria monocytogenes* requires the product of the *prfA* gene. *J Bacteriol*; **174**(2):568-74
  27. **Chakraborty T, Ebel F, Wehland J, Dufrenne J, Notermans S.** (1994). Naturally occurring virulence-attenuated isolates of *Listeria monocytogenes* capable of inducing long term protection against infection by virulent strains of homologous and heterologous serotypes. *FEMS Immunol Med Microbiol*; **10**(1):1-9 Related Articles, Books, LinkOut
  28. **Chakraborty T., Ebel F., Domann E., Niebuhr K., Gerstel B., Pistor S., Temm Grove C. J., Jockusch B. M., Reinhard M., Walter U.** (1995). A focal adhesion factor directly linking intracellularly motile *Listeria monocytogenes* and *Listeria ivanovii* to the actin-based cytoskeleton of mammalian cells. *EMBO J.* **14** (7): 1314-1321.
  29. **Chakraborty T, Wehland J.** (1997). The host cell infected with *Listeria monocytogenes*. In: Kaufmann: The Host response to intracellular pathogens. R.G. Landes Company, Austin, Texas, U.S.A., pp 271-290
  30. **Chakraborty T, Hain T, Domann E.** (2000). Genome organization and the evolution of the virulence gene locus in *Listeria* species. *Int J Med Microbiol*; **290**(2):167-74
  31. **Chen J, Brosch R, Luchansky JB.** (1993) Isolation and characterization of *Listeria monocytogenes*-specific nucleotide sequences *Appl Environ Microbiol* **59**:4367-4370.
  32. **Conlan JW, North RJ.** (1994). Neutrophils are essential for early anti-*Listeria* defense in the liver, but not in the spleen or peritoneal cavity, as revealed by a granulocyte-depleting monoclonal. *J Exp Med*; **179**(1):259-68 antibody
  33. **Darbouche A.** (Diplomarbeit 1996) Genetische und Biochemische Untersuchungen einer Beta-Glucosidase und Herstellung von Deletionsmutanten in *Listeria monocytogenes*. Institut für Medizinische Mikrobiologie, Justus-Liebig Universität Gießen
  34. **Darji A, Chakraborty T, Wehland J, Weiss S.** (1995). Listeriolysin generates a route for the presentation of exogenous antigens by major histocompatibility complex class I. *Eur J Immunol*; **25**(10):2967-71
  35. **Decatur AL, Portnoy DA.** (2000). A PEST-like sequence in listeriolysin O essential for *Listeria monocytogenes* pathogenicity. *Science*; **290**(5493):992-5
  36. **Dhar G, Faull KF, Schneewind O.** (2000). Anchor structure of cell wall surface proteins in *Listeria monocytogenes*. *Biochemistry* **39**(13):3725-33
  37. **Dickneite, C., Böckmann, R., Spory, A., Goebel, W., Sokolovic, Z.** (1998). Differential interaction of the transcription factor PrfA and the PrfA-activation factor (Paf) of *Listeria monocytogenes* with target sequences. *Mol. Microbiol.* **27**, 915-928
  38. **Domann E, Wehland J, Rohde M, Pistor S, Hartl M, Goebel W, Leimeister-Wachter M, Wuenscher M, Chakraborty T.** (1992). A novel bacterial virulence gene in *Listeria monocytogenes* required for host cell microfilament interaction with homology to the proline-rich region of vinculin. *EMBO J*; **11**(5):1981-90
  39. **Domann E., Zechel S., Lingnau A., Hain T., Darji A., Nichterlein T., Wehland J., Chakraborty T.** (1997). Identification and characterisation of a novel PrfA-regulated gene in *Listeria monocytogenes* whose product, *irpA*, is highly homologous to internalin proteins, which contain leucine-rich repeats. *Infect Immun* **65**(1):101-109
  40. **Domann E.** (1998). Pathogenitätsfaktoren bakterieller Krankheitserreger. Deutsche Medizinische Wochenschrift. **123**: 229-236
  41. **Dramsi S, Kocks C, Forestier C, Cossart P.** (1993). Internalin-mediated invasion of epithelial cells by *Listeria monocytogenes* is regulated by the bacterial growth state, temperature and the pleiotropic activator *prfA*. *Mol Microbiol*; **9**(5):931-41
  42. **Dramsi S., Biswas I., Maguin E., Braun L., Mastroeni P., Cossart P.** (1995). Entry of *Listeria monocytogenes* into hepatocytes

- requires expression of InlB, a surface protein of the internalin multigene family. *Mol. Biol.* **16**: 251-261.
43. **Dramsi S, Dehoux P, Lebrun M, Goossens PL, Cossart P.** (1997). Identification of four new members of the internalin multigene family of *Listeria monocytogenes* EGD. *Infect Immun*; **65**(5):1615-25
  44. **Dunn PL, North RJ.** (1991). Early gamma interferon production by natural killer cells is important in defense against murinelisteriosis. *Infect Immun Sep*; **59**(9):2892-900
  45. **Elsner HA, Sobottka I, Bubert A, Albrecht H, Laufs R, Mack D.** (1996). Catalase-negative *Listeria monocytogenes* causing lethal sepsis and meningitis in an adult hematologic patient. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*; **15**(12):965-7
  46. **Engelbrecht, F., S.-K. Chun, C. Ochs, J. Hess, F. Lottspeich, W. Goebel, and Z. Sokolovic.** (1996). A new PrfA-regulated gene of *Listeria monocytogene* encoding a small, secreted protein which belongs to the family of internalins. *Mol. Microbiol.* **21**: 823-837
  47. **Engelbrecht, F., G. Dominguez-Bernal, J. Hess, C. Dickneite, L. Greiffenbeg, R. Lampidis, D. Raffelsbauer, J. J. D. Daniels, J. Kreft, S. H. E. Kaufmann, J.-A. Vazquez-Boland, and W. Goebel.** (1998). A novel PrfA-regulated chromosomal Locus, which is specific for *Listeria ivanovii*, encodes two small, secreted internalins and contributes in mice. *Mol. Microbiol.* **30**: 405-417
  48. **Engelman DM, Steitz TA, Goldman A.** (1986): Identifying nonpolar transbilayer helices in amino acid sequences of membrane proteins. *Annu Rev Biophys Biophys Chem*; **15**:321-53
  49. **Hahn/ Falke/ Kaufmann/ Ullmann** (2000) *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie*. Springer Verlag.
  50. **Farber J.M., Peterkin P.L.** (1991). *Listeria monocytogenes*, a food borne pathogen. *Microbiol. Reviews.* **55**/3: 476-511.
  52. **Freitag N. E., Youngman P, Portnoy D. A.** (1992). Transcriptional activation of the *Listeria monocytogenes* hemolysin gene in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* ;**174**(4):1293-8
  53. **Fruman DA, Meyers RE, Cantley LC.** (1998). Phosphoinositide kinases. *Annu Rev Biochem* ;**67**:481-507
  54. **Gaillard J.L., Berche P., Frehel C., Gouin E., Cossart P.** (1991). Entry of *L. monocytogenes* into Cells is Mediated by Internalin, a repeat Protein Reminiscent of Surface Antigens from Gram-Positive Cocci. *Cell.* **68**: 1227-1141.
  55. **Gaillard J.L., Jaubert F., Berche P.** (1996). The inlAB Locus Mediates the Entry of *Listeria monocytogenes* into Hepatocytes In Vivo. *J. Exp. Med.* **183**: 359-369.
  56. **Galan J. E.** (1996). Molecular and Genetic bases of *Salmonella* Entry Into Host Cells. *Mol. Biol.* **20**:263-271
  57. **Gellin B. G., Broome C. V.** (1989). Listeriosis. *JAMA*; **261**(9):1313-20
  58. **Geoffroy C., Gaillard J. L., Alouf J. E., Berche P.** (1987). Purification, characterisation, and toxicity of the sulfhydryl-activated hemolysin listeriolysin O from *Listeria monocytogenes*. *Infect. Immun* **55** (7): 1641-1646
  59. **Glaser P. et al.** (2001) Comparative genomics of *Listeria* species. *Science*: in press
  60. **Gouin E, Mengaud J, Cossart P.** (1994). The virulence gene cluster of *Listeria monocytogenes* is also present in *Listeria ivanovii*, an animal pathogen, and *Listeria seeligeri*, a nonpathogenic species. *Infect Immun*; **62**(8):3550-3
  61. **Goebel W., Leimeister-Wächter M., Kuhn M., Domann E., Chakraborty T., Kohler S., Bubert A., Wuenscher M., Sokolovic Z.** (1993). *Listeria monocytogenes* a model for studying the pathomechanisms of intracellular microorganism. *Int. J. Med. Microbiol. Virol. Parasitol. Infect. Dis.* **278** (2-3): 334-347
  62. **Goldfine, H., and K. Knob.** (1992). Purification and characterisation of *Listeria monocytogenes* phosphatidylinositol-specific phospholipase C. *Infect. Immun.* **60**: 4059-4067
  63. **Goldfine H, Knob C, Alford D, Bentz J.** (1997). Membrane permeabilization by *Listeria monocytogenes* phosphatidylinositol-specific phospholipase C is independent of phospholipid hydrolysis and cooperative with listeriolysin O. *Proc Natl Acad Sci U S A* ; **94**(6):2772
  64. **Guzman C. A., Rohde M., Chakraborty T., Domann E., Hudel M., Wehland J., Timmis K. N.** (1995). Interaction of *Listeria monocytogenes* with mouse dendritic cells. *Infect Immun.* **63** (9): 3665-3673
  65. **Guzman CA, Domann E, Rohde M, Bruder D, Darji A, Weiss S, Wehland J, Chakraborty T, Timmis KN.** (1996). Apoptosis of mouse dendritic cells is triggered by listeriolysin, the major virulence determinant of *Listeria monocytogenes*. *Mol Microbiol* ; **20**(1):119-26
  66. **Hacker J., Blum-Oehler G., Mühldorfer I., Tschäpe H.** (1997). Pathogenicity Islands of Virulent Bacteria: Structure, Function and Impact on Microbiol Evolution. *Molec. Microbiol.* **23**:1089-1097

67. **Hahn, H. et al.** (1998): Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York. Kap.13: 335
68. **Hain T.** (Dissertation 1998): Zellbiologische und molekulargenetische Analyse des Internalin vermittelten Invasionsmechanismus von *Listeria monocytogenes*. Institut für Medizinische Mikrobiologie, Justus-Liebig-Universität Giessen.
69. **Haker J. und Heesemann J.** (2000). Molekulare Infektionsbiologie, Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg. Berlin
70. **Hanahan J., Jessee J., Bloom F.R.** (1991). Plasmid Transformation in *E. coli* and Other Bacteria. *Methods Enzymologie* **204**: 111-121.
71. **Hauf N, Goebel W, Fiedler F, Sokolovic Z, Kuhn M.** (1997). *Listeria monocytogenes* infection of P388D1 macrophages results in a biphasic NF-kappaB (RelA/p50) activation induced by lipoteichoic acid and bacterial phospholipases and mediated by IkappaBalpha and IkappaBbeta degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **94**(17):9394-9
72. **Hauf N, Goebel W, Fiedler F, Kuhn M.** (1999). *Listeria monocytogenes* infection of Caco-2 human epithelial cells induces activation of transcription factor NF-kappa B/Rel-like DNA binding activities. *FEMS Microbiol Lett.*, **178**(1):117-22.
73. **Hillig RC, Renault L, Vetter IR, Drell T 4th, Wittinghofer A, Becker J.** (1999). The crystal structure of rnalp: a new fold for a GTPase-activating protein. *Mol Cell*; **3**(6):781-91
74. **Ireton K., Payraastre B., Chap H., Ogawa W., Sakaue H., Kasuga M., Cossart P.** (1996). A role for phosphoinositide 3-kinase in bacterial invasion. *Science* **274** (5288): 780-782
75. **Ireton K, Cossart P.** (1997). Host-pathogen interactions during entry and actin-based movement of *Listeria monocytogenes*. *Annu Rev Genet*; **31**:113-38
76. **Jackson, R.L., S. J. Busch, and A.D. Cardin.** (1991). Glycosaminoglycans: molecular properties, protein interactions, and role in physiological process. *Physiol. Rev.*; **2**:481-523
77. **Jonquieres R, Bierne H, Mengaud J, Cossart P.** (1998). The *inlA* gene of *Listeria monocytogenes* LO28 harbors a nonsense mutation resulting in release of internalin. *Infect Immun*; **66**(7):3420-2
78. **Jones D, Seeliger H.** (1992). The genus *Listeria*. In *The Prokaryotes*, 2nd ed., Springer Verlag, Heidelberg. pp 1595-1616.
79. **Jungi TW, Valentin-Weigand P, Brcic M.** (1999). Differential induction of NO synthesis by gram-positive and gram-negative bacteria and their components in bovine monocyte-derived macrophages. *Microb Pathog*; **27**(1):43-53
80. **Karita M, Etterbeek ML, Forsyth MH, Tummuru MK, Blaser MJ.** (1997). Characterization of *Helicobacter pylori* dapE and construction of a conditionally lethal dapE mutant. *Infect Immun.* **65**(10):4158-64
81. **Kayser F. H. et al.** (1993). Medizinische Mikrobiologie. Georg Thiem Verlag Stuttgart. New York,.
82. **Kobe B, Deisenhofer J.** (1993). Crystal structure of porcine ribonuclease inhibitor, a protein with leucine-rich repeats. *Nature*; **366**(6457):751-6
83. **Kobe B., Deisenhofer J.** (1995). Proteins with leucin-rich repeats. *Curr opin Struc. Biol* **5**:409-416
84. **Kohler S, Leimeister-Wachter M, Chakraborty T, Lottspeich F, Goebel W.** (1990). The gene coding for protein p60 of *Listeria monocytogenes* and its use as a specific probe for *Listeria monocytogenes*. *Infect Immun*; **58**(6):1943-50
85. **Kocks C, Gouin E, Tabouret M, Berche P, Ohayon H, Cossart P.** (1992). *L. monocytogenes*-induced actin assembly requires the actA gene product, a surface protein.  
**Kohler S, Bubert A, Vogel M, Goebel W.** (1991). Expression of the *iap* gene coding for protein p60 of *Listeria monocytogenes* is controlled on the posttranscriptional level. *J Bacteriol*; **173**(15):4668-74
86. **Kuhn M, Goebel W.** (1989): Identification of an extracellular protein of *Listeria monocytogenes* possibly involved in intracellular uptake by mammalian cells. *Infect Immun*; **57**(1):55-61
87. **Kuhn M, Goebel W.** (1995). Molecular studies on the virulence of *Listeria monocytogenes*. *Genet Eng (N Y)*; **17**:31-51
88. **Kyte J., Doolittle RF.** (1982). A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J. Mol. Biol.* **157** (1): 105-132.
89. **Lasa I, Dehoux P, Cossart P.** (1998). Actin polymerization and bacterial movement. *Biochim Biophys Acta*; **1402**(3):217-28
90. **Lebrun M, Mengaud J, Ohayon H, Nato F, Cossart P.** (1996). Internalin must be on the bacterial surface to mediate entry of *Listeria monocytogenes* into epithelial cells. *Mol Microbiol* **21**(3):579-92
91. **Lecuit M, Vandormael-Pournin S, Lefort J,**

- Huerre M, Gounon P, Dupuy C, Babinet C, Cossart P. (2001). A transgenic model for listeriosis: role of internalin in crossing the intestinal barrier. *Science*; **292**(5522):1722-5
92. Leimeister-Wächter M., Haffner C., Domann E., Goebel W., Chakraborty T. (1990). Identification of a gene that positively regulates expression of Listeriolysin, the major virulence factor of *Listeria monocytogenes*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **87**: 8336-8340.
  93. Leimeister-Wächter M., Domann E., Chakraborty T. (1991). Detection of a gene encoding a phosphatidylinositol-specific phospholipase C that is co-ordinately expressed with listeriolysin in *Listeria monocytogenes*. *MolMicrobiol* **5**(2): 361-266
  94. Leimeister-Wächter M., Domann E., Chakraborty T. (1992). The Expression of virulence gene in *Listeria monocytogenes* is Thermoregulated. *J. Bacteriol.* **174**: 947-952
  95. Leung K. Y., Straley S. C. (1989). The yopM gene of *Yersinia pestis* encodes a released protein having homology with the human platelet surface protein GPIb alpha. *J Bacteriol*; **171**(9):4623-32
  96. Leung K. Y., Reisner B. S., Straley S. C.. (1990). YopM inhibits platelet aggregation and is necessary for virulence of *Yersinia pestis* in mice. *Infect Immun*; **58**(10):3262-71
  97. Lewin B. (1991). Gene VHC Verlagsgesellschaft mbH Weinheim (Bundesrepublik Deutschland),.
  98. Lingnau A., Domann E., Hudel M., Bock M., Nichterlein T., Wehland J., Chakraborty T. (1995). Expression of the *Listeria monocytogenes* EGD *inlA* and *inlB* genes, whose products mediate bacterial entry into tissue culture cell lines, by PrfA-dependent and -independent mechanisms. *Infect. Immun* **63** (10): 3896-3903
  99. Lingnau A, Chakraborty T, Niebuhr K, Domann E, Wehland J. (1996). Identification and purification of novel internalin-related proteins in *Listeria monocytogenes* and *Listeria ivanovii*. *Infect Immun*. **64**(3):1002-6
  100. a) Loessner MJ, Wendlinger G, Scherer S. (1995). Heterogeneous endolysins in *Listeria monocytogenes* bacteriophages: a enzymes and evidence for conserved holin genes within the siphoviral lysis cassettes. *Mol Microbiol Jun*; **16**(6):1231-41
  101. b) Loessner MJ, Schneider A, Scherer S. (1995). A new procedure for efficient recovery of DNA, RNA, and proteins from *Listeria* cells by rapid lysis with a recombinant bacteriophage endolysin. *Appl Environ Microbiol* **61**:1150-1152.
  102. Mackaness G. (1962). Cellular resistance to infection. *J. Exp. Med.*, **116**: 381-406
  103. Machesky LM, Insall RH. (1998). Scarl and the related Wiskott-Aldrich syndrome protein, WASP, regulate the actin cytoskeleton through the Arp2/3 complex. *Curr Biol*; **8**(25):1347-56
  104. Marino M, Braun L, Cossart P, Ghosh P. (1999). Structure of the InlB leucine-rich repeats, a domain that triggers host cell invasion by the bacterial pathogen *L. monocytogenes*. *Mol Cell*; **4**(6):1063-72
  105. Marino M, Braun L, Cossart P, Ghosh P. 2000. A framework for interpreting the leucine-rich repeats of the *Listeria* internalins. *Proc Natl Acad Sci U S A*; **97**(16):8784-8
  106. McKay D. B., Steitz T.A. (1981). Structure of catabolite gene activator protein at 2.9 Å resolution suggests binding to left-handed B-DNA. *Nature*; **290**(5809):744-9
  107. McLauchlin, J. (1987). *Listeria monocytogenes*, recent advances in the taxonomy and epidemiology of listeriosis in humans, *Journal of Applied Bacteriology*, **63**, pp. 1-11.
  108. Mekalanos J.J. (1992). Environmental signals controlling expression of virulence determinants in bacteria. *J. Bacteriol.* **174**: 1-7.
  109. Mengaud J, Chenevert J, Geoffroy C, Gaillard JL, Cossart P. (1987). Identification of the structural gene encoding the SH-activated hemolysin of *Listeria monocytogenes*: listeriolysin O is homologous to streptolysin O and pneumolysin. *Infect Immun*; **55**(12):3225-7 Related Articles, Books, Protein, Nucleotide
  110. Mengaud J, C. Braun-Breton, and P. Cossart. (1991)a. Identification of phosphatidylinositol-specific phospholipase C activity in *Listeria monocytogenes*: a novel type of virulence factor? *Mol. Microbiol.* **5**: 367-372
  111. Mengaud J., Dramsi S., Gouin E., Vasquez-Boland J.A., Milon G., Cossart P. (1991)b. Pleiotropic control of *Listeria monocytogenes* virulence factors by a gene that is autoregulated. *Mol. Microbiol.* **5**: 2273-2283.
  112. Mengaud J, Ohayon H, Gounon P, Mege R M, Cossart P. (1996). E-cadherin is the receptor for internalin, a surface protein required for entry of *L. monocytogenes* into epithelial cells. *Cell*; **84**(6):923-932

113. **Metcalf D. R., Campbell P. A.** (1994). How does gamma-interferon mediate resistance to *Listeria monocytogenes*? Trends Microbiol. Jun; 2(6):206-8
114. **Mombaerts P., Arnoldi J., Russ F.** (1993). Different roles of a:b and g:s T cells in immunity against an intracellular bacterial pathogen. Nature 365:53-56
115. **Murray, E.G.D., R.E. Webb, M.B.R. Swann.** (1926). A disease of rabbits characterized by a large mononuclear leucocytosis, caused by a hitherto undescribed bacillus *Bacterium monocytogenes* (n.sp.). J. Pathol. Bacteriol. 29, 407.
116. **Navarre WW, Schneewind O.** (1994). Proteolytic cleavage and cell wall anchoring at the LPXTG motif of surface proteins in gram-positive bacteria. Mol Microbiol 4(1):115-21
117. **Niebuhr K, Ebel F, Frank R, Reinhard M, Domann E, Carl UD, Walter U, Gertler FB, Wehland J, Chakraborty T.** (1997). A novel proline-rich motif present in ActA of *Listeria monocytogenes* and cytoskeletal proteins is the ligand for the EVH1 domain, a protein module present in the Ena/VASP family. : EMBO J Sep 1;16(17):5433-44
118. **Ölschläger T., Hacker J.** (1999). Bacterial Invasion into Eukaryotic Cells. London (Plenum Press)
119. **Ohkura H, Yanagida M S.** (1991). pombe gene sds22+ essential for a midmitotic transition encodes a leucine-rich repeat protein that positively modulates protein phosphatase-1. Cell; 64(1):149-57
120. **Otten, S.** (Dissertation 2001): Charakterisierung und Identifizierung präferenziell intrazellulär exprimierter Gene aus *L. monocytogenes*. Institut für Medizinische Mikrobiologie, Justus-Liebig-Universität Giessen
121. **Pabo C. O., Lewis M.** (1982). The operator-binding domain of lambda repressor: structure and DNA recognition. Nature; 298 (5873):443-7.
122. **Pashalidis P.** (Dissertation 1998): Molekular- und zellbiologische Analyse des Invasionsmechanismus von *Listeria monocytogenes* in eukaryontische Zellkulturen. Institut für Medizinische Mikrobiologie, Justus-Liebig-Universität Giessen
123. **Parida S. K., Domann E., Rohde M., Müller S., Darji A., Hain T., Wehland J., Chakraborty T.** (1998). Internalin B is essential for adhesion and mediates the invasion of *Listeria monocytogenes* into endothelial cells. Mol Microbiol 28(1): 81-93
124. **Park S. F., Kroll R. G.** (1993). Expression of listeriolysin and phosphatidylinositol-specific phospholipase C is repressed by the plant-derived molecule cellobiose in *Listeria monocytogenes*. Molecular Microbiology 8 (4): 653-661.
125. **Parsot C, Sansonetti P.J.** (1996). Invasion and the pathogenesis of *Shigella* infections. Curr Top Microbiol Immunol;209:25-42
126. **Pfeuffer T, Goebel W, Laubinger J, Bachmann M, Kuhn M** (2000) LaXp180, a mammalian ActA-binding protein, identified with the yeast two-hybrid system, co-localizes with intracellular *Listeria monocytogenes*.
127. **Platt T.** (1986). Transcription termination and regulation of gene expression. Annu. Rev. Biochem. 55:339-372
128. **Portnoy D. A., Chakraborty T., Goebel W., Cossar P.** (1992). Molecular Determinants of *Listeria monocytogenes* Pathogenesis. Infection and Immunity, Apr.: 1263-1267.
129. **Poyart C, Trieu-Cuot P, Berche P.** (1996). The inlA gene required for cell invasion is conserved and specific to *Listeria monocytogenes*. Microbiology 142 ( Pt 1):173-180
130. **Poyart-Salmeron C, Carlier C, Trieu-Cuot P, Courtieu AL, Courvalin P.** (1990) Transferable plasmid-mediated antibiotic resistance in *Listeria monocytogenes*. Lancet 16:1422-1426
131. **Pribnow D.** (1975). Nucleotid sequence of an RNA polymerase binding site at an early T7 promotor. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72: 784-788.
132. **Pugsley AP.** (1990). Translocation of proteins with signal sequences across membranes. Curr Opin Cell Biol; 2(4):609-16
133. **Racz P., Tenner K., Mero E.** (1972). Experimental *Listeria enteritis* I. An electron microscopic study of the epithelial phase in experimental *Listeria* infection. Lab Invest 26(6):694-700
134. **Raffelsbauer D, Bubert A, Engelbrecht F, Scheinpflug J, Simm A, Hess J, Kaufmann SH, Goebel W.** (1998). The gene cluster inlC2DE of *Listeria monocytogenes* contains additional new internalin genes and is important for virulence in mice. Mol Gen Genet; 260(2-3):144-58
135. **Raveneau J., Geoffroy C., Beretti J.L., Gaillard J.L., Alouf J.E., Berche P.** (1992). Reduced virulence of *Listeria monocytogenes* phospholipase-deficient mutant obtained by transposon insertion into the zinc metalloprotease gene. Infect. Immun. 60: 916-921.
136. **Rechsteiner M, Rogers SW.** (1996). PEST sequences and regulation by proteolysis. Trends Biochem Sci; 21(7):267-71









137. Renouf S, Beullens M, Wera S, Van Eynde A, Sikela J, Stalmans W, Bollen M. (1995). Molecular cloning of a human polypeptide related to yeast sds22, a regulator of protein phosphatase-1. FEBS Lett ;375(1-2):75-8
138. Rocourt J., Schrettenbrunner A., Seeliger H.P.R. (1983). Differentiation biochimique des groupes génomiques de *Listeria monocytogenes* (sensu lato). Ann. Microbiol. 134A: 489-497F.
139. Rocourt J., Catimel B. (1985). Caractérisation Biochimique des espèces du genre *Listeria*. Zbl. Bacteriol. Hyg. A 259: 489-497.
140. Rogers S, Wells R, Rechsteiner M. (1986). Amino acid sequences common to rapidly degraded proteins: the PEST hypothesis. Science; 234(4774):364-8
141. Rosenshine I., Finlay B. B. (1993). Exploitation of host signal transduction pathways and cytoskeletal functions by Invasive Bacteria. BioEssays 15:17-24
142. Rudnicka W, Kaczmarek M, Szeliga J, Germann T, Wieckowska M, Rozalska B. (1997). The host response to *Listeria monocytogenes* mutants defective in genes encoding phospholipases C (plcA, plcB) and actin assembly (actA). Microbiol Immunol.; 41(11):847-53 Related Articles, Books
143. Salyers AA, Whitt DD. (1994). Bacterial Pathogenesis - A molecular approach, Chapter 15 *Listeria monocytogenes*. ASM Press, Washington. pp 182-189
144. Sanchez J, Castillo G, Medrano AI, Martinez-Palomo A, Rodriguez MH. (1995). In vitro growth of *Vibrio cholerae* in cholera stool fluid leads to differential expression of virulence factors. Arch Med Res.;26 Spec No:S47-53
145. Sanchez-Campillo M, Dramsi S, Gomez-Gomez JM, Michel E, Dehoux P, Cossart P, Baquero F, Perez-Diaz JC. (1995). Modulation of DNA topology by *flaR*, a new gene from *Listeria monocytogenes*. Mol Microbiol;18(5):801-11
146. Schaferkordt S, Chakraborty T. (1997). Identification, cloning, and characterization of the *Ima* operon, whose gene products are unique to *Listeria monocytogenes*. J Bacteriol; 179(8):2707-16
147. Scheffer J, König W, Braun V, Goebel W. (1988). Comparison of four hemolysin-producing organisms (*Escherichia coli*, *Serratia marcescens*, *Aeromonas hydrophila*, and *Listeria monocytogenes*) for release of inflammatory mediators from various cells. J Clin Microbiol; 26(3):544-51
148. Schneewind O, Model P, Fischetti VA. (1992). Sorting of protein A to the staphylococcal cell wall. Cell, 70(2):267-81
149. Schneewind O, Mihaylova-Petkov D, Model P. (1993). Cell wall sorting signals in surface proteins of gram-positive bacteria. EMBO J ;12(12):4803-11
150. Schneewind O, Fowler A, Faull KF. (1995). Structure of the cell wall anchor of surface proteins in *Staphylococcus aureus*. Science; 268(5207):103-6
151. Schuchat A., B. Swaminathan, C. Broome. (1991). Epidemiologie of Human Listeriose. Clin. Microbiol. Review. 4/2: 169-183.
152. Schwan WR, Kugler S, Schuller S, Kopecko DJ, Goebel W. (1996). Detection and characterization by differential PCR of host eukaryotic cell genes differentially transcribed following uptake of intracellular bacteria. Infect Immun; 64(1):91-9
153. Schwartz, D. C., and C. R. Cantor. (1984). Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. Cell 37:67-75.
154. Schwarzer N, Nost R, Seybold J, Parida SK, Fuhrmann O, Krull M, Schmidt R, Newton R, Hippenstiel S, Domann E, Chakraborty T, Suttorp N. (1998). Two distinct phospholipases C of *Listeria monocytogenes* induce ceramide generation, nuclear factor-kappa B activation, and E-selectin expression in human endothelial cells. J Immunol Sep 15;161(6):3010-8
155. Sharma A, Sojar HT, Glurich I, Honma K, Kuramitsu HK, Genco RJ. (1998). Cloning, expression, and sequencing of a cell surface antigen containing a leucine-rich repeat motif from *Bacteroides forsythus* ATCC 43037. Infect Immun; 66(12):5703-10
156. Shen Y, Naujokas M, Park M, Ireton K. (2000). InlB-dependent internalization of *Listeria* is mediated by the Met receptor tyrosine kinase. Cell; 103(3):501-10
157. Shine J., Delgarno L., (1975). Determinant of cistron specificity in bacterial ribosomes. Nature 254: 34-38.
158. Shevchenko DV, Akins DR, Robinson E, Li M, Popova TG, Cox DL, Radolf JD. (1997). Molecular characterization and cellular localization of TplRR, a processed leucine-rich repeat protein of *Treponema pallidum*, the syphilis spirochete. J Bacteriol; 179(10):3188-95
159. Seeliger, H.P.R. (1961): Listeriosis. (Verlag S. Karger, Basel - New York).
160. Seeliger, H.P.R., D. Jones. (1986). Genus *Listeria*. S. 1235-1237. In: Sneath, P.H., N.S.

- Mair, M.E. Sharp, J.G. Holt (Hrsg.): Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Band 2, 8. Aufl. Williams and Wikins, Baltimore, USA
161. **Sibeliu U, Schulz EC, Rose F, Hattar K, Jacobs T, Weiss S, Chakraborty T, Seeger W, Grimminger F.** (1999): Role of *Listeria monocytogenes* exotoxins listeriolysin and phosphatidylinositol-specific phospholipase C in activation of human neutrophils. *Infect Immun*; **67**(3):1125-30
  162. **Sibeliu U, Chakraborty T, Krogel B, Wolf J, Rose F, Schmidt R, Wehland J, Seeger W, Grimminger F.** (1996). The listerial exotoxins listeriolysin and phosphatidylinositol-specific phospholipase C synergize to elicit endothelial cell phosphoinositide metabolism. *J Immunol*; **157**(9):4055-60
  163. **Seeliger (H.P.R.) et Jones (D.)** (1986): Genus *Listeria* Pirie 1940, 383AL. In : P.H.A. Sneath, N.S. Mair, M.E. Sharpe and J.G. Holt (ed.) Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, vol. 2, The Williams & Wilkins Co., Baltimore, pp. 1235-1245.
  164. **Seeliger H.P.R.** Listeriosis. Karger S. (Ed), Hafner Publishing co., New York 1961.
  165. **Seeliger H.P.R., Höhne K.** (1979). Serotyping of *L. monocytogenes* and related species. *Methods in Microbiol.* **13**: 31-49
  166. **Seeliger H.P.R., Jones D., Pirie.** (1986). Genus *Listeria* : in Bergey's Manual of systematic bacteriology Sneath P.H.A., Mair N.S., Sharpe M.E., Holt J.G. /Eds.). Williams and Wilkins, Baltimore: 1235-1245.
  167. **Shevchenko D. V., Akins D. R., Robinson E., Li M., Popova T. G., Cox D.L., Radolf J. D.** (1997). Molecular characterization and cellular localization of TpLRR, a processed leucine-rich repeat protein of *Treponema pallidum*, the syphilis spirochete. *J Bacteriol* **179**(10): 3188-3195
  168. **Sobel, M., D. F. Soler, J. C. Kermode, and R. B. Harris.** (1992). Localization and characterization of a heparin binding domain peptide of human von Willebrand factor. *J. Biol. Chem.* **267**: 8857-8862
  169. **Sokolovic Z, Schuller S, Bohne J, Baur A, Rdest U, Dickneite C, Nichterlein T, Goebel W.** (1996). Differences in virulence and in expression of PrfA and PrfA-regulated virulence genes of *Listeria monocytogenes* strains belonging to serogroup 4. *Infect Immun*; **64**(10):4008-19
  170. **Sonnhammer, E.L.L., Von Heijne, G., Krogh, A.** (1998). A hidden Markov model for predicting transmembrane helices in protein sequences. In J. Glasgow et al., eds., Proc. Sixth Int. Conf. On Intelligent Systems for molecular Biology, 175-182. AAAI Press
  171. **Southern, E. M.** (1975). *J. Mol. Biol.* **98**:503-517
  172. **Swartz MA, Welch DF, Narayanan RP, Greenfield RA.** (1991). Catalase-negative *listeria monocytogenes* causing meningitis in an adult. Clinical and laboratory features. *Am J Clin Pathol*; **96**(1):130-3
  173. **Takeichi M.** (1991). Cadherin cell adhesion receptors as a morphogenetic regulator. *Science*; **251**(5000):1451-5
  174. **Tang P, Rosenshine I, Cossart P, Finlay BB.** (1996). Listeriolysin O activates mitogen-activated protein kinase in eucaryotic cells. *Infect Immun*; **64**(6):2359-61.
  175. **Tortosa P, Dubnau D.** (1999) Competence for transformation: a matter of taste. *Curr Opin Microbiol* **2**:588-592
  176. **Trusolino L, Serini G, Cecchini G, Besati C, Ambesi-Impimbato FS, Marchisio PC, De Filippi R.** (1998). Growth factor-dependent activation of alphavbeta3 integrin in normal epithelial cells: implications for tumor invasion. *J Cell Biol*; **142**(4):1145-56
  177. **Vazquez-Boland J., Kocks C., Dramsi S., Ohayon H., Geoffroy C., Mengaud J., Cossart P.** (1992). Nucleotide sequence of the lecithinase operon of *Listeria monocytogenes* and possible role of lecithinase in cell-to-cell spread. *Infect. Immun.* **60**: 219-230
  178. **Vazquez-Boland JA, Kuhn M, Berche P, Chakraborty T, Dominguez-Bernal G, Goebel W, Gonzalez-Zorn B, Wehland J, Kreft J.** (2001). *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. *Clin Microbiol Rev*; **14**(3):584-640
  179. **Von Both, U., S. Otten, A. Darbouche, E. Domann, and T. Chakraborty.** (1999). Physical and genetic map of the *Listeria monocytogenes* EGD serotype 1/2a chromosome. *FEMS Mikrobiol. Lett.* **175**: 281-289
  180. **Wadsworth SJ, Goldfine H.** (1999): *Listeria monocytogenes* phospholipase C-dependent calcium signaling modulates bacterial entry into J774 macrophage-like cells. *Infect Immun* Apr; **67**(4):1770-8 Related Articles, Books, LinkOut
  181. **Weber R.** (1991). Medizinische Mikrobiologie. Verlag der Ferber'schen Universitätsbuchhandlung.
  182. **Weiglein I, Goebel W, Troppmair J, Rapp UR, Demuth A, Kuhn M.** (1997). *Listeria monocytogenes* infection of HeLa cells results in listeriolysin O-mediated transient activation of the Raf-MEK-MAP kinase pathway. *FEMS Microbiol Lett* Mar 15; **148**(2):189-95
  183. **Welch MD, Iwamatsu A, Mitchison TJ.** (1997). Actin polymerization is induced by

- Arp2/3 protein complex at the surface of *Listeria monocytogenes*. *Nature*; **385**(6613): 265-9
184. **Wuenscher MD, Kohler S, Bubert A, Gerike U, Goebel W.** (1993). The iap gene of *Listeria monocytogenes* is essential for cell viability, and its gene product, p60, has bacteriolytic activity. *J Bacteriol*; **175**(11):3491-501
185. **Xiong H, Kawamura I, Nishibori T, Mitsuyama M.** (1994). Cytokine gene expression in mice at an early stage of infection with various strains of *Listeria* spp. differing in virulence. *Infect Immun*; **62**(9):3649-54
186. **Zhang, H, Seabra, M. C., Deisenhofer J.** (2000). Crystal structure of Rab geranylgeranyltransferase at 2.0 Å resolution. *Structure Fold*; **8**(3):241-51



## Gesamte Sequenz des *inlFDE*-Locus in *L. monocytogenes* EGD-e

	ascB und dapE = Haushaltsgene				
	InlF		RBS		Signalpeptid
	InlD		Terminator	☆	Stop codon
	InlE		-10, -35		

9					18			27			36			45			54	
CAA	TTG	CTG	ACG	GCG	TAG	ATT	TAA	TGG	GTT	ACA	CAA	GCT	GGG	GTC	CAA	TCG	ACC	
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	
I	A	D	G	V	D	L	M	G	Y	T	S	W	G	P	I	D	L	
63					72			81			90			99			108	
TAG	TAA	GTG	CCT	CCA	CAA	GCG	AAA	TGT	CCA	AAC	GTT	ACG	GCT	TCA	TCT	ACG	TAG	
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	
V	S	A	S	T	S	E	M	S	K	R	Y	G	F	I	Y	V	D	
117					126			135			144			153			162	
ACC	AAG	ATG	ACT	GGG	GCA	AAG	GAA	CAT	TAG	AAC	GCT	CCC	GCA	AAG	ATT	CAT	TCT	
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	
Q	D	D	W	G	K	G	T	L	E	R	S	R	K	D	S	F	F	
171					180			189			198			207			216	
TCT	GGT	ATA	AAA	AAG	TAA	TTG	AAA	CAA	ATG	GTG	AAG	ATT	TAG	ATT	AAT	AGG	TAG	
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	
W	Y	K	K	V	I	E	T	N	G	E	D	L	D	*				
225					234			243			252			261			270	
AGT	ACA	GCC	CCG	CTT	TGG	CGG	GGC	TGT	TTT	TTT	TAC	GCT	ACT	TCC	CAC	AAG	AAA	
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	
279					288			297			306			315			324	
CCA	ATT	CTG	TAA	TCG	CTG	AAC	GAA	AAA	GTT	CAA	TTA	ATT	GTC	ACA	TCT	TTC	GTG	
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	
333					342			351			360			369			378	
TAG	AAG	GGT	CTA	ATG	CGA	GAA	AAA	ATG	GCG	GGC	ATC	TTC	TGT	TAT	AAT	TAT	TCA	
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	
387					396			405			414			423			432	
TCA	AAG	ACT	AGT	AAT	ATT	TTA	CGC	CAA	GTC	ATC	CAA	GAT	AGT	GCA	GAT	CCA	AGG	
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	-35	---	---	---	---	---	---	
441					450			459			468			477			486	
TGT	ATT	TAA	TGA	TGA	ATT	ATC	TAC	TCA	GTC	AAA	TTA	TAA	GGA	GAC	GAT	AAA	ATG	
---	---	-10	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	RBS	---	---	---	---	
495					504			513			522			531			540	
AAA	CAG	AGA	AAA	ACC	TCA	GTA	CTA	CAT	GTT	TTA	CTT	GTA	GTG	ACA	GCT	ATC	TTG	
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	
K	Q	R	K	T	S	V	L	H	V	L	L	V	V	T	A	I	L	

		549			558			567			576			585			594
GGA	ATT	AGT	TTA	TGG	GTA	AAT	GCA	AGT	CAT	GGG	ATG	AAA	GCT	CAG	GCA	GAG	AGT
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
G	I	S	L	W	V	N	A	S	H	G	M	K	A	Q	A	E	S
		603			612			621			630			639			648
ATT	GCG	CAA	CCA	GCG	CCA	ATT	AAC	GAA	ATT	TTC	ACG	GAT	CCA	GCA	TTA	GCG	GAC
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
I	A	Q	P	A	P	I	N	E	I	F	T	D	P	A	L	A	D
		657			666			675			684			693			702
GAG	GTG	AAG	ACG	GAA	CTT	GGA	AAA	ACT	AGT	GTC	ACT	GAT	GAA	GTT	ACG	CAG	ACA
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
E	V	K	T	E	L	G	K	T	S	V	T	D	E	V	T	Q	T
		711			720			729			738			747			756
GAT	TTG	AAT	CAG	ATA	ACT	AAA	CTT	GAA	GCA	GAC	GAC	AAA	GGA	ATA	AAT	TCA	ATA
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
D	L	N	Q	I	T	K	L	E	A	D	D	K	G	I	N	S	I
		765			774			783			792			801			810
GAG	GGA	ATA	CAA	TAT	TTA	ACT	AAT	TTG	AAT	ATG	TTG	GGT	GTA	TCT	TCC	AAT	CAG
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
E	G	I	Q	Y	L	T	N	L	N	M	L	G	V	S	S	N	Q
		819			828			837			846			855			864
ATT	ACT	AAT	ATT	ACA	CCT	CTT	GCC	AAT	CTT	ACT	AAT	TTA	GAT	TCT	TTA	TAT	TTA
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
I	T	N	I	T	P	L	A	N	L	T	N	L	D	S	L	Y	L
		873			882			891			900			909			918
GGA	GAT	AAT	AAA	ATT	AGT	GAT	GTG	ACG	CCA	CTT	TCA	GGA	TTG	ACA	CAG	TTA	ACA
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
G	D	N	K	I	S	D	V	T	P	L	S	G	L	T	Q	L	T
		927			936			945			954			963			972
TTC	GTA	CAA	TTA	TCT	ATC	AAT	CAA	ATA	AAA	GAT	GTG	ACA	CCT	CTT	GCT	AAT	CTA
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
F	V	Q	L	S	I	N	Q	I	K	D	V	T	P	L	A	N	L
		981			990			999			1008			1017			1026
ACG	AAA	TTA	AAT	TAT	TTA	GAT	TTA	CGA	GAA	AAT	CAA	ATA	AGT	GAT	GCA	AGT	CCT
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
T	K	L	N	Y	L	D	L	R	E	N	Q	I	S	D	A	S	P
		1035			1044			1053			1062			1071			1080
TTA	GTT	AAT	ATG	ACT	GAT	TTA	ACG	GTT	TTA	CAT	TTA	GAA	AAA	CAA	CAA	ATA	ACA
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
L	V	N	M	T	D	L	T	V	L	H	L	E	K	Q	Q	I	T
		1089			1098			1107			1116			1125			1134
GCC	GCG	CCA	GTC	GTA	TAT	CAA	ACT	AAT	TTA	GTT	GCA	CCA	GAT	ATT	TTG	AAA	AAT
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
A	A	P	V	V	Y	Q	T	N	L	V	A	P	D	I	L	K	N
		1143			1152			1161			1170			1179			1188
GCT	TAT	GGT	GAA	GTA	GTA	CCA	CCA	ACA	ACG	ATT	AGT	AAT	AAC	GGA	ACC	TTT	GCT
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
A	Y	G	E	V	V	P	P	T	T	I	S	N	N	G	T	F	A

1197	1206	1215	1224	1233	1242
AGT CCA AAT ATC	ACT TGG AAC TTA	GAT AGT TTC ACG	AGT GAG GTT AGT	TAT GAT	
---	---	---	---	---	---
S P N I T W N L D S F T S E V S Y D					
1251	1260	1269	1278	1287	1296
TTT AAT CAA AAA	ATC ACA CTA GGT	GAT AAT GGG AAG	GTA ACT TTT GCA	GGA ACT	
---	---	---	---	---	---
F N Q K I T L G D N G K V T F A G T					
1305	1314	1323	1332	1341	1350
GTT GTT CAA CCG	ATA GTA GAA GCG	CCC GTG AAT TAC	ATT ACT ACA TTT	GAT GTG	
---	---	---	---	---	---
V V Q P I V E A P V N Y I T T F D V					
1359	1368	1377	1386	1395	1404
GAT GGA ACG ACG	ACG ACA GAA AAC	GTG GTA GTG GAT	ACA TTA ATA ACC	GAA CCT	
---	---	---	---	---	---
D G T T T T E N V V V D T L I T E P					
1413	1422	1431	1440	1449	1458
GCT GAA CCG ACA	AAA GAA GGT TAT	ACT TTT TCT GGT	TGG TAT GAT GCG	GAA ACT	
---	---	---	---	---	---
A E P T K E G Y T F S G W Y D A E T					
1467	1476	1485	1494	1503	1512
GGT GGG AAT GAA	TGG GAT TTT GCA	GTA GAT AAA ATG	CCG GCT ACG AAT	ATG ACA	
---	---	---	---	---	---
G G N E W D F A V D K M P A T N M T					
1521	1530	1539	1548	1557	1566
CTT TAC GCA CAG	TTC ACG ATA AAC	AGC TAC ACA GCG	ACA TTT GAT GTG	GAT GGT	
---	---	---	---	---	---
L Y A Q F T I N S Y T A T F D V D G					
1575	1584	1593	1602	1611	1620
GAA ACA ACT AAT	CAA AAA GTA GAT	TAC CAA GCT CTG	CTA CAA GAA CCG	ACT GCT	
---	---	---	---	---	---
E T T N Q K V D Y Q A L L Q E P T A					
1629	1638	1647	1656	1665	1674
CCG ACG AAA GAT	GGC TAC ACA TTT	GTA GGA TGG TAT	GAT GCA AAA ACG	GGT GGA	
---	---	---	---	---	---
P T K D G Y T F V G W Y D A K T G G					
1683	1692	1701	1710	1719	1728
ACT GAA TGG GAT	TTC GCA ACT AGC	AAA ATG CCA ACT	AGT GAT ATA ACT	TAT	
---	---	---	---	---	---
T E W D F A T S K M P T S D I T L Y					
1737	1746	1755	1764	1773	1782
GCT AGA TTT ACT	AAA AAT CCT AGC	TCA GAC AAT TCT	CAA ACA GCT CCC	GGA AAG	
---	---	---	---	---	---
A R F T K N P S S D N S Q T A P G K					
1791	1800	1809	1818	1827	1836
ATG ATT AAA AAC	GAC AAA GAT AAA	CTA ACA ATT AAA	GCT AAC GAC AGC	GCA GAT	
---	---	---	---	---	---
M I K N D K D K L T I K A N D S A D					

1845	1854	1863	1872	1881	1890
GCG ACG AGT ACT	AAA CTT CCA	AAA ACA AGT	GAT GAT TCA	AGT ATG ATT	CCT ACT
---	---	---	---	---	---
A	T	S	T	K	L
P	K	T	S	D	D
S	S	M	I	P	T
1899	1908	1917	1926	1935	1944
ATT TTA GGA ACG	CTT TTC ATC	GGA GGT GCA	ATA CTA ATC	TTA CGA AAA	AAA ACT
---	---	---	---	---	---
I	L	G	T	L	F
I	G	G	A	I	L
I	L	R	K	K	T
1953	1962	1971	1980	1989	1998
ACT AAC ATT TAA	GAT AAA GTA	GAT TTG GTT	TCT ATT TTC	AGT AGA GAC	CAA ATT
---	---	---	---	---	---
T	N	I	*		
2007	2016	2025	2034	2043	2052
TTT TTG TTA ATT	TGG TCT AAA	AAA GGG	TAT CTA TTA	TTA ATG ACT	TAT TTA GAA
---	---	---	---	---	---
		-35-			
2061	2070	2079	2088	2097	2106
GAA TAA TTA	GTG AAT CTA	ATT TAA ATA	AA GGA GAG	GGA TTA TGA	AAA AAC GGT
---	---	---	---	---	---
	-10-		RBS		
				M	K
				K	R
				W	
2115	2124	2133	2142	2151	2160
GGA ATT CAG TAT	TCA AAC TAG	TTT TAA TGG	TAG CTG CTA	TTC TCG GTA	TTA GTC
---	---	---	---	---	---
N	S	V	F	K	L
V	L	M	V	A	A
I	L	G	I	S	L
2169	2178	2187	2196	2205	2214
TAT ATG TAA CGA	CAA GCC AAG	GTG TGG AGG	TTC GGG CAG	AGA GCA TCA	CGC AGC
---	---	---	---	---	---
Y	V	T	T	S	Q
G	V	E	V	R	A
2223	2232	2241	2250	2259	2268
CAA CCG CAA TTA	ATG TGA TTT	TCC CTG ATC	CAG CTC TTG	CGA ATG CAA	TTA AAA
---	---	---	---	---	---
T	A	I	N	V	I
F	P	D	P	A	L
A	N	A	I	K	I
2277	2286	2295	2304	2313	2322
TAG CGG CTG GAA	AAT CTA ATG	TAA CAG ATA	CTG TCA CGC	AAG CGG ATT	TAG ATG
---	---	---	---	---	---
A	A	G	K	S	N
V	T	D	T	V	T
Q	A	D	L	D	G
2331	2340	2349	2358	2367	2376
GAA TAA CTA CTT	TAT CAG CAT	TTG GGA CTG	GAG TAA CAA	CGA TAG AAG	GAG TGC
---	---	---	---	---	---
I	T	T	L	S	A
F	G	T	G	V	T
T	T	I	E	G	V
Q					
2385	2394	2403	2412	2421	2430
AGT ACT TAA ATA	ATT TGA TAG	GGT TAG AAC	TTA AAG ATA	ACC AAA TAA	CTG ATT
---	---	---	---	---	---
Y	L	N	N	L	I
G	L	E	L	K	D
N	Q	I	T	D	L
2439	2448	2457	2466	2475	2484
TAA CTC CTC TTA	AAA ATT TAA	CGA AAA TAA	CAG AAC TTG	AAT TAT CTG	GAA ACC
---	---	---	---	---	---
T	P	L	K	N	L
T	K	I	T	E	L
E	L	S	G	N	P

2493	2502	2511	2520	2529	2538
CGT TAA AAA ATG	TGA GCG CGA TTG	CTG GGT TAC AAA	GCA TAA AAA	CGC TAG	ACC
---	---	---	---	---	---
L K N V	S A I A	G L Q S	I K T	L D	L
2547	2556	2565	2574	2583	2592
TAA CTT CTA CGC	AAA TTA CAG	ATG TGA CCC	CAC TTG CAG	GTC TTT CCA	ATT TGC
---	---	---	---	---	---
T S T Q	I T D V	T P L A	G L S	N L	Q
2601	2610	2619	2628	2637	2646
AGG TAT TAT ATT	TGG ATC TCA	ATC AAA TAA	CCA ATA TAA	GCC CGC TTG	CAG GAC
---	---	---	---	---	---
V L Y L	D L N Q	I T N I	S P L	A G	L
2655	2664	2673	2682	2691	2700
TAA CTA ATT TAC	AAT ACT TAT	CAA TCG GAA	ATG CCC AAG	TAA GTG ATT	TAA CCC
---	---	---	---	---	---
T N L Q	Y L S I	G N A Q	V S D	L T	P
2709	2718	2727	2736	2745	2754
CAC TTG CTA ATT	TAT CTA AAC	TAA CTA CTT	TAA AAG CTG	ATG ATA ATA	AAA TAA
---	---	---	---	---	---
L A N L	S K L T	T L K A	D D N	K I	S
2763	2772	2781	2790	2799	2808
GTG ATA TTT CGC	CAC TTG CTA	GTT TAC CTA	ATC TTA TAG	AAG TTC ATT	TGA AAA
---	---	---	---	---	---
D I S P	L A S L	P N L I	E V H	L K	N
2817	2826	2835	2844	2853	2862
ATA ATC AAA TTA	GTG ATG TTA	GCC CAC TTG	CGA ATA CTT	CAA ACT TAT	TTA TTG
---	---	---	---	---	---
N Q I S	D V S P	L A N T	S N L	F I	V
2871	2880	2889	2898	2907	2916
TCA CTT TAA CGA	ATC AAA CAA	TTA CCA ACC	AAC CTG TGT	TTT ATC AAA	ATA ATC
---	---	---	---	---	---
T L T N	Q T I T	N Q P V	F Y Q	N N	L
2925	2934	2943	2952	2961	2970
TTG TCG TCC CTA	ATG TAG TAA	AAG GTC CTT	CTG GCG CGC	CTA TTG CAC	CCG CTA
---	---	---	---	---	---
V V P N	V V K G	P S G A	P I A	P A	T
2979	2988	2997	3006	3015	3024
CTA TTA GTG ACA	ATG GAA CAT	ACG CAA GCC	CAA ATT TAA	CAT GGA ATT	TAA CTA
---	---	---	---	---	---
I S D N	G T Y A	S P N L	T W N	L T	S
3033	3042	3051	3060	3069	3078
GTT TTA TTA ATA	ATG TTA GTT	ATA CTT TTA	ACC AAT CAG	TCA CTT TCA	AAA ATA
---	---	---	---	---	---
F I N N	V S Y T	F N Q S	V T F	K N	T
3087	3096	3105	3114	3123	3132
CAA CGG TTC CTT	TCA GTG GGA	CAG TTA CAC	AAC CAT TAA	CAG AAG CTT	ACA CTG
---	---	---	---	---	---
T V P F	S G T V	T Q P L	T E A	Y T	A

3141	3150	3159	3168	3177	3186
CGG TTT TTG ACG	TGG ACG GGA AGC	AAA CAA GTG TGA	CAG TCG GCG CGA	ATG AAT	
---	---	---	---	---	---
V F D V	D G K Q	T S V T	V G A N	E L	
3195	3204	3213	3222	3231	3240
TAA TTA AAG AAC	CAA CGG CCC CGA	CGA AAG AAG GTT	ACA CTT TCA CAG	GCT GGT	
---	---	---	---	---	---
I K E P	T A P T	K E G Y	T F T G	W Y	
3249	3258	3267	3276	3285	3294
ATG ATG CGA AAA	CTG GCG GAA CTA	AAT GGG ATT TTG	CGA CAG ATA AAA	TGC CAG	
---	---	---	---	---	---
D A K T	G G T K	W D F A	T D K M	P A	
3303	3312	3321	3330	3339	3348
CAG AGG ACA TCA	CAT TAT ACG CGC	AGT TTA CGA TTA	ATA GTT ACA CAG	CCA CAT	
---	---	---	---	---	---
E D I T	L Y A Q	F T I N	S Y T A	T F	
3357	3366	3375	3384	3393	3402
TTG ATA TTG ATG	GTA AAT TAA CGA	CTC AAA AAG TCA	CTT ATC AAA GCT	TGC TAG	
---	---	---	---	---	---
D I D G	K L T T	Q K V T	Y Q S L	L E	
3411	3420	3429	3438	3447	3456
AAG AAC CAG TAG	CGC CAA CGA AGG	ATG GCT ATA CGT	TCA CAG GTT GGT	ATG ATG	
---	---	---	---	---	---
E P V A	P T K D	G Y T F	T G W Y	D A	
3465	3474	3483	3492	3501	3510
CTA AAA CGG GTG	GAA CTA AAT CGG	ATT TTG CGA CAG	GGA AAA TGC CAG	CGG GAA	
---	---	---	---	---	---
K T G G	T K S D	F A T G	K M P A	G N	
3519	3528	3537	3546	3555	3564
ATA TAA CAC TAT	ACG CCC AGT TCA	CTA AAA ATG ACA	ACC CGA ATC CCG	ATG ATC	
---	---	---	---	---	---
I T L Y	A Q F T	K N D N	P N P D	D P	
3573	3582	3591	3600	3609	3618
CAA CTA CCA ATA	CCC CAA CAG GAA	ATG GTG ATG GTA	CAA GTA ACC CAA	GTA ATT	
---	---	---	---	---	---
T T N T	P T G N	G D G T	S N P S	N S	
3627	3636	3645	3654	3663	3672
CAG GAG GCA ATA	CCA CAC TTC CAA	CAG CTG GTG ACG	AAA ATA CCA TGC	TTC CGA	
---	---	---	---	---	---
G G N T	T L P T	A G D E	N T M L	P I	
3681	3690	3699	3708	3717	3726
TTT TTA TCG GGG	TTT TCT TGC TAG	GAA CAG CGA CGC	TAA TTC TCC GCA	AAA CAA	
---	---	---	---	---	---
F I G V	F L L G	T A T L	I L R K	T I	
3735	3744	3753	3762	3771	3780
TCA AAG TAA AAT	AAC AAC AAA AAA	AGC TGA GGT CTA	TAG TTT TTC TAT	AGG CTT	
---	---	---	---	---	---
K V K *					

3789	3798	3807	3816	3825	3834
CAG CTT TTT TAT	TAG TAG ATA AAT TCA TCT	AAA CGT CAC AAC TAA ATC	GTT AAC		
---	---	---	---	---	---
3843	3852	3861	3870	3879	3888
AAG TCT AAT TTT	AGT GAT TAA ACG AAA TCC	TAC TAC GCT ATA ATA	TAG TGA CT		
---	---	---	---	---	---
				-35	
3897	3906	3915	3924	3933	3942
AAC TAC GAG AAC	ATA CAA ATT TCT AAA AAG	CAG AAT TAC	TTT ATA	AAG GAG ATA	
---	---	---	---	---	---
			-10		RBS
3951	3960	3969	3978	3987	3996
GTT TAA TGA AAA	GAA ACA AAA CAG	CAT TAA GAA TCT	TAG TCA CTT	TAG CTG	TAG
---	---	---	---	---	---
M	K	R	N	K	T
A	L	R	I	L	V
T	L	A	V	V	
4005	4014	4023	4032	4041	4050
TAT TGG CAA TTA	CTT TTT GGG TAG	GGA TGA GCT CAA	AAG AAG TAC	AAG CAG	CGG
---	---	---	---	---	---
L	A	I	T	F	W
V	G	M	S	S	K
E	V	Q	A	A	V
4059	4068	4077	4086	4095	4104
TGA TTG AAC ACC	CAA CCC CTA TTA	ACG GAA ATT TTA	CTG ATC CAG	TGC TTA	CTG
---	---	---	---	---	---
I	E	H	P	T	P
I	N	G	N	F	T
D	P	V	L	T	D
4113	4122	4131	4140	4149	4158
ATA ATG TAA AAA	CAC TGC TCG GAA	AAG CGG ATG TAA	CAG ACG AAG	TTA CGC	AAA
---	---	---	---	---	---
N	V	K	T	L	L
G	K	A	D	V	T
D	E	V	T	Q	T
4167	4176	4185	4194	4203	4212
CCG ACT TAG ATA	GTG TAA CTC ATT	TAT CAG CAA	AAT CAG CAG	GAA TAA	CAA CAA
---	---	---	---	---	---
D	L	D	S	V	T
H	L	S	A	K	S
A	G	I	T	T	I
4221	4230	4239	4248	4257	4266
TAG AAG GAT TGC	AGT ATC TAA CTA	ATT TAT CGG	AAT TAG AAT	TAA TAG	ATA ATC
---	---	---	---	---	---
E	G	L	Q	Y	L
T	N	L	S	E	L
E	L	I	D	N	Q
4275	4284	4293	4302	4311	4320
AAG TAA CCG ATT	TAA ATC CTC TTA	CTA ATT TAA	CGA AAA TAA	CAG AAC	TTA GAT
---	---	---	---	---	---
V	T	D	L	N	P
L	T	N	L	T	K
I	T	E	L	R	L
4329	4338	4347	4356	4365	4374
TAT CTG GAA ATC	CGT TAA AAG	ATG TGA GCG	CGC TTG CTG	GAT TAA	AAA ATC
---	---	---	---	---	---
S	G	N	P	L	K
D	V	S	A	L	A
G	L	K	N	L	K
4383	4392	4401	4410	4419	4428
AAA CGA TGG ATC	TTA TTT ATA	CAG ATA TTA	CGG ATG TGA	CAC CAC	TTG CAG
---	---	---	---	---	---
T	M	D	L	I	Y
T	D	I	T	D	V
T	P	L	A	G	L

4437	4446	4455	4464	4473	4482
TTT CCA ATT TAC	AGG TGT TAA ATT	TAG ATA TCA ATC	AAA TAA CTG	ATA TAA CTC	
---	---	---	---	---	---
S N L Q	V L N L	D I N Q	I T D I	T P	
4491	4500	4509	4518	4527	4536
CAC TTG CAG GAC	TAT CTA ATT TAC	AAT TTT TAT CGT	TCG GAA GTA CTC	AAG TAA	
---	---	---	---	---	---
L A G L	S N L Q	F L S F	G S T Q	V S	
4545	4554	4563	4572	4581	4590
GTG ATT TGA CGC	CAC TTG CTA ATT	TAT CTA AAC TAA	CCG CAC TAA	ACG CTA TGA	
---	---	---	---	---	---
D L T P	L A N L	S K L T	A L N A	M N	
4599	4608	4617	4626	4635	4644
ATA GTA AAG TAA	GCG ATG TTT CTC	CAC TTA CTG	GTT TAT CTA	ATC TCA CAG	AAG
---	---	---	---	---	---
S K V S	D V S P	L T G L	S N L T	E V	
4653	4662	4671	4680	4689	4698
TTT ATT TGG AAG	AGA ATC AAA TTA	GTG ATG TGA GTC	CGC TTG CAA	AAT TAC CCA	
---	---	---	---	---	---
Y L E E	N Q I S	D V S P	L A K L	P N	
4707	4716	4725	4734	4743	4752
ACT TAT CTA TTG	TTA CTT TAA CGA	ATC AAA CAA TCA	CCA ACC AAC	CCG TAT TTT	
---	---	---	---	---	---
L S I V	T L T N	Q T I T	N Q P V	F Y	
4761	4770	4779	4788	4797	4806
ATC AAA ATA AAC	CTA TCG TTC CTA	ATG TAG TAA CTG	GCC TTT CTG	GTG AGC TTA	
---	---	---	---	---	---
Q N K P	I V P N	V V T G	L S G E	L I	
4815	4824	4833	4842	4851	4860
TTG CAC CGG ATA	CTA TTA GCG ACA	ATG GAA CAT ACA	CTA GTC CCA	ATT TAA CGT	
---	---	---	---	---	---
A P D T	I S D N	G T Y T	S P N L	T W	
4869	4878	4887	4896	4905	4914
GGG ATT TAA ACA	GCT TCA TTA ATA	GTG TTA GTT ACA	CAT TTA ACC	AAT CAG TCA	
---	---	---	---	---	---
D L N S	F I N S	V S Y T	F N Q S	V T	
4923	4932	4941	4950	4959	4968
CTT TCA AAA ATA	CAA CGG TTC CTT	TCA GTG GAA CAG	TTA CAC AAC	CAT TAA CAG	
---	---	---	---	---	---
F K N T	T V P F	S G T V	T Q P L	T E	
4977	4986	4995	5004	5013	5022
AAG TTT ACG CTG	TAG TTT TTG ATG	TGG ACG GAG AGC	AAA CAA GTG	CGA TGG TAG	
---	---	---	---	---	---
V Y A V	V F D V	D G E Q	T S A M	V G	
5031	5040	5049	5058	5067	5076
GTG TGA ATG AAT	TAA TTA ACG AAC	CAA CTG CTC	CAG CCA AGG	AAG GTT ATA	TAT
---	---	---	---	---	---
V N E L	I N E P	T A P A	K E G Y	I F	



5085	5094	5103	5112	5121	5130
TCG ATG GAT GGT	ATG ACG CAA	AAA CAG ACG	GGA ATA AAT	GGG ACT TTG	GGA TAG
---	---	---	---	---	---
D	G	W	Y	D	A
K	T	D	G	N	K
W	D	F	G	I	D
5139	5148	5157	5166	5175	5184
ATA AAA TGC CTG	CTA GTG ATA	TAA CTT TAT	ATG CTA AGT	TCA CTG AGA	ACG AAG
---	---	---	---	---	---
K	M	P	A	S	D
I	T	L	Y	A	K
F	T	E	N	E	E
5193	5202	5211	5220	5229	5238
AAC CAA ATG CTA	GTA GTC CAA	TTA ATG TGG	AAC CAA ATG	ACA ATA ATT	CAG ACA
---	---	---	---	---	---
P	N	A	S	S	P
I	N	V	E	P	N
D	N	N	S	D	N
5247	5256	5265	5274	5283	5292
ATG CAG AAC CAA	ATG CTA GTA	GTT CAA ATA	ATG TAC AAG	AAA ATG GAA	CTA ACG
---	---	---	---	---	---
A	E	P	N	A	S
S	S	N	N	V	Q
E	N	G	T	N	E
5301	5310	5319	5328	5337	5346
AGG GAA TAA ATA	ATC TGA ACA	GTT CAG GTG	AAG ATA AAG	TCA ACA TCA	AGT TAC
---	---	---	---	---	---
G	I	N	N	L	N
S	S	G	E	D	K
V	N	I	K	L	P
5355	5364	5373	5382	5391	5400
CGA TTA CTG GAG	ATA AAT TGA	ATG TGC TTC	CTA TTT TTG	TAG GAG CAG	TTC TTA
---	---	---	---	---	---
I	T	G	D	K	L
N	V	L	P	I	F
V	G	A	V	L	I
5409	5418	5427	5436	5445	5454
TCG GAA TTG GCT	TAG TTT TAT	TCC GCA AAA	AAC GTC AAA	CAA AAT AAA	CCA ATC
---	---	---	---	---	---
G	I	G	L	V	L
F	R	K	K	R	Q
T	K	*			
5463	5472	5481	5490	5499	5508
AAT GGC TTG GCT	TCT GTA AAT	CAT GCA GAG	ACT AAG CCA	TTT TTT ATT	TGG TAA
---	---	---	---	---	---
5517	5526	5535	5544	5553	5562
TTA TAA GAA GGA	GTT TGC CTT	TAT AGA GAA	CGG GAA AAC	ATA GAG TGG	AAT TCA
---	---	---	---	---	---
5571	5580	5589	5598	5607	5616
TAG AAA GAG GGC	GTG AAA TAT	GGA CCA ACA	AAA AAA GAT	TCA AAT TTT	AAA GGA
---	---	---	---	---	---
M	D	Q	Q	K	K
I	Q	I	L	K	D
5625	5634	5643	5652	5661	5670
CTT GGT AAA TAT	TGA TTC GAC	TAA TGG GCA	TGA AGA ACA	AGT TGC GAA	CTA TTT
---	---	---	---	---	---
L	V	N	I	D	S
T	N	G	H	E	E
Q	V	A	N	Y	L
5679	5688	5697	5706	5715	5724
GCA AAA GTT GTT	AGC TGA ACA	TGG TAT TGA	GTC CGA AAA	GGT ACA ATA	CGA CCT
---	---	---	---	---	---
Q	K	L	L	A	E
H	G	I	E	S	E
K	V	Q	Y	D	L

5733	5742	5751	5760	5769	5778
AGA CAG AGC TAG CCT AGT AAG CGA AAT TGG TTC CAG TAA CGA GAA GGT TTT GGC					
---	---	---	---	---	---
D R A S L V S E I G S S N E K V L A					
5787	5796	5805	5814	5823	5832
ATT TTC AGG GCA TAT GGA TGT AGT TGA TGC GGG TGA TGT ATC TAA GTG GAA GTT					
---	---	---	---	---	---
F S G H M D V V D A G D V S K W K F					
5841	5850	5859	5868	5877	5886
CCC ACC TTT TGA AGC GAC AGA GCA TGA AGG GAA ACT ATA CGG ACG CGG CGC AAC					
---	---	---	---	---	---
P P F E A T E H E G K L Y G R G A T					
5895	5904	5913	5922	5931	5940
GGA TAT GAA GTC AGG TCT AGC GGC GAT GGT TAT TGC AAT GAT TGA ACT TCA TGA					
---	---	---	---	---	---
D M K S G L A A M V I A M I E L H E					
5949	5958	5967	5976	5985	5994
AGA AAA ACA AAA ACT AAA CGG CAA GAT CAG ATT ATT AGC AAC AGT TGG GGA AGA					
---	---	---	---	---	---
E K Q K L N G K I R L L A T V G E E					
6003	6012	6021	6030	6039	6048
GAT CGG TGA ACT TGG AGC AGA ACA ACT AAC ACA AAA AGG TTA CGC AGA TGA TTT					
---	---	---	---	---	---
I G E L G A E Q L T Q K G Y A D D L					
6057	6066	6075	6084	6093	6102
ACA TGG TTT AAT CAT CGG CGA ACC GAG TGG ACA CAG AAT CGT TTA TGC GCA TAA					
---	---	---	---	---	---
H G L I I G E P S G H R I V Y A H K					
6111	6120	6129	6138	6147	6156
AGG TTC CAT TAA TTA TCC CGT TAA ATC CAC TGG TAA AAA TGC CCA TAG TTC GAT					
---	---	---	---	---	---
G S I N Y P V K S T G K N A H S S M					
6165	6174	6183	6192	6201	6210
GCC GGA ATC TGG TGT GAA TGC GAT TGA TAA CTT GCT GCT ATT TTA TAA TGA AGT					
---	---	---	---	---	---
P E S G V N A I D N L L L F Y N E V					
6219	6228	6237	6246	6255	6264
AGA AAA ATT CGT GAA ATC AGT TGA TGC TAC TAA CGA AAT ATT AGG CGA TTT TAT					
---	---	---	---	---	---
E K F V K S V D A T N E I L G D F I					
6273	6282	6291	6300	6309	6318
TCA TAA TGT CAC CGT AAT TGA TGG TGG AAA TCA AGT CAA TAG TAT CCC TGA AAA					
---	---	---	---	---	---
H N V T V I D G G N Q V N S I P E K					
6327	6336	6345	6354	6363	6372
AGC ACA ACT GCA AGG GAA TAT TCG CTC GAT TCC AGA AAT GGA TAA TGA AAC AGT					
---	---	---	---	---	---
A Q L Q G N I R S I P E M D N E T V					

6381	6390	6399	6408	6417	6426
GAA ACA AGT GCT	AGT GAA GAT TAT	CAA TAA GTT AAA	CAA ACA GGA AAA	TGT GAA	
---	---	---	---	---	---
K Q V L	V K I I	N K L N	K Q E N	V N	
6435	6444	6453	6462	6471	6480
TCT GGA ATT AAT	ATT TGA TTA TGA	TAA ACA ACC AGT	ATT TAG TGA TAA	AAA TTC	
---	---	---	---	---	---
L E L I	F D Y D	K Q P V	F S D K	N S	
6489	6498	6507	6516	6525	6534
GGA TTT AGT CCA	CAT TGC TAA GAG	CGT AGC AAG CGA	CAT TGT CAA AGA	AGA AAT	
---	---	---	---	---	---
D L V H	I A K S	V A S D	I V K E	E I	
6543	6552	6561	6570	6579	6588
CCC ATT ACT CGG	TAT TTC CGG AAC AAC	CGA TGC AGC AGA	ATT TAC CAA	AGC TAA	
---	---	---	---	---	---
P L L G	I S G T	T D A A	E F T K	A K	
6597	6606	6615	6624	6633	6642
GAA AGA GTT CCC	AGT GAT TAT TTT	TGG ACC AGG AAA	CGA AAC CCC	TCA CCA	AGT
---	---	---	---	---	---
K E F P	V I I F	G P G N	E T P H	Q V	
6651	6660	6669	6678	6687	6696
AAA CGA AAA TGT	TTC TAT AGG AAA	TTA TTT GGA	GAT GGT AGA	TGT TTA	CAA
---	---	---	---	---	---
N E N V	S I G N	Y L E M	V D V Y	K R	
6705	6714	6723	6732	6741	6750
GAT TGC CAC CGA	GTT TTT ATC TTG	ATG AAA CTT	TAA CTT TAC	TTA TTT	CCC
---	---	---	---	---	---
I A T E	F L S *				
6759	6768	6777	6786	6795	6804
ATA AAA TAA GTA	ATT AAT AGA AGT	CTA GTA TTT	GTT TGT AAA	CAG GCG	CTA
---	---	---	---	---	---
6813	6822	6831	6840	6849	6858
TTT TTT CTT GCT	TTT AAT ACA GTT	TAG TAC TAA ACT	AAT AAT ATC AAG	AGG AGG	
---	---	---	---	---	---
6867	6876	6885	6894	6903	6912
GAA CGA ACA TGG	TAA AAA AAG AAG	AAA GGC TAG	GGG TTT TGC	TTT GGT	TTC
---	---	---	---	---	---
	M V	K K	E E	R L	G V
					L L
					W F
					R F
6921	6930	6939	6948	6957	6966
TTA GTC GTT TTT	ATA ATC GAA ATA	TGA AGC TGA	CCA ATC AGA	ATT TGC	GAG
---	---	---	---	---	---
S R F Y	N R N M	K L T N	Q N L R	A A	
6975	6984	6993	7002	7011	7020
CAG GGA TTT CAA	CGG CGC AGT TTG	ATT GCA TTG	CCC AAA TTG	GCT TAG	ACA
---	---	---	---	---	---
G I S T	A Q F D	C I A Q	I G L D	K E	

7029				7038			7047			7056			7065			7074		
AGA	TTA	CAC	AGC	AAC	AAC	TTG	CCG	AAA	AAT	TAG	TCG	TAA	CAA	AGG	GAA	ATG	TCA	
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	
I	T	Q	Q	Q	L	A	E	K	L	V	V	T	K	G	N	V	T	
7083				7092			7101			7110			7119			7128		
CCC	AAC	TCC	TCG	CAA	AAT	TAG	AGC	AAT	TAG	GTT	ATA	TTA	CGC	GAA	CAA	AAA	CAG	
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	
Q	L	L	A	K	L	E	Q	L	G	Y	I	T	R	T	K	T	G	
7137				7146			7155			7164			7173			7182		
GAC	GCG	AGA	AGC	ATA	TTA	CCC	TCA	CAG	AAA	AAG	GTC	AAG	CAT	GTT	ACC	GAG	AAA	
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	
R	E	K	H	I	T	L	T	E	K	G	Q	A	C	Y	R	E	N	
7191				7200														
ATG	TCC	CAA	ACA	AGA	AGC	TT	3'											
---	---	---	---	---	---	---	---											
V	P	N	K	K	L													

## Gesamte Sequenz des *inlG*-Genes in *L. monocytogenes* EGD-e

Signalpeptid    ☆ Stop codon

Terminator

-10, -35

RBS

		9		18		27		36		45		54					
GGT	ACG	TCC	ATT	TGA	TTT	TGT	AAT	TAT	TAT	TTT	ACT	AAT	CTT	GGG	TTC	GTT	TTT
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
		63		72		81		90		99		108					
ACC	ACT	AAT	ATT	ATT	TTT	GTC	GCT	GAA	GCA	AAA	CAT	GTG	GGC	GAT	GAT	GTC	GTA
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
		117		126		135		144		153		162					
GCG	ATT	ATT	TCA	CAA	GAT	GGC	AAA	GTA	ATT	CGG	GAA	ATC	CCG	CTA	ACT	GGT	CAT
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
		171		180		189		198		207		216					
AAA	GGC	AAT	GAG	CAG	TTT	ACG	ATT	AAA	GGA	AAA	GGC	GCA	CAA	TAT	AAT	TTG	ATG
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
		225		234		243		252		261		270					
GAA	GTA	GAT	GGC	GAA	CGG	ATT	CGA	ATA	AAA	GAA	GAC	AAC	AGC	CCA	GAT	CAA	GTA
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
		279		288		297		306		315		324					
GGC	GTC	AAA	ATG	GGT	TGG	AAA	TCC	AAA	GCC	GGT	GAC	ACC	ATT	GTT	TGT	TTA	CCA
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
		333		342		351		360		369		378					
CAT	AAA	GTT	TTC	GTA	GAG	ATA	AAA	TCG	ACA	AAC	AAA	AAA	AGC	AAA	GAC	CCC	GAT
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
		387		396		405		414		423		432					
ACA	GAT	TTA	ATT	GTG	CCG	AAT	TAA	ACA	CAC	TAA	GTG	ATT	AGT	GTG	TTT	TTT	TGT
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
		441		450		459		468		477		486					
TTG	AAC	AAC	TAA	TTT	AAA	AAT	TAT	TGT	CAA	ATT	TAT	GTC	ACA	TGT	TTT	CAT	TGT
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
		495		504		513		522		531		540					
CGC	TGC	TTA	TGT	ATC	TAA	GAA	ACA	GAA	ATA	AGG	AGC	GGA	AAT	TTG	CAT	ATT	AAA
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
		549		558		567		576		585		594					
ATT	AGA	CAA	CTA	CTT	CAA	AGT	AAG	GTG	TTA	CAA	TCA	ATA	AGC	TAT	AAT	AAT	GAT
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
		603		612		621		630		639		648					
TCT	AAT	TTA	GCT	TAA	TGA	AAG	GAA	AGA	CTA	ATA	TGA	AAT	CTA	AAA	ATA	ATT	ATT
---	---	---	---	---	---	---	RBS	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

711	720	729	738	747	756
GTA TTC AAG GTA ATA ATG ATG TTA AAG CAG CGC CAC AGG TCG CGC CAC CAG CAT					
I Q G N N D V K A	A P Q V A P P A S				
765	774	783	792	801	810
CAA TTA ATC AAA TTT TTC CTG ATG CAG ATT TAG CGG AGG GAA TAC GAG CGG AAC					
I N Q I F P D A D L A E G I R A E L					
819	828	837	846	855	864
TTC AAA AAT CAA GTG TCA CAG ATG TAG TAA CGA AAG AAG AAT TAG AAA GCA TTT					
Q K S S V T D V V T K E E L E S I S					
873	882	891	900	909	918
CGC AAC TGT CGG TAT ACG CGA AAA AAA TAG CTT CTA TTG AAG GGC TTG AGT ATT					
Q L S V Y A K K I A S I E G L E Y L					
927	936	945	954	963	972
TAA CCA ATT TGA AAT TTT TAA ATC TTA ATG GAA ACC AAA TTA CAG ATC TCA GCC					
T N L K F L N L N G N Q I T D L S P					
981	990	999	1008	1017	1026
CAT TAA GCA ATT TAA CAA AAC TAA CGG AAA TTT ATA TTG GTG ATA ATA AAA TTT					
L S N L T K L T E I Y I G D N K I S					
1035	1044	1053	1062	1071	1080
CTG ATA TTA GTC GGC TTC AAA ACC TAA CTA ATG TGA CTG ACT TAT ATC TAG TAG					
D I S R L Q N L T N V T D L Y L V D					
1089	1098	1107	1116	1125	1134
ATA ATG ATA TTA GTG ATT TAA GGC CAT TAG CTA ATT TAA CCC AAA TGT ATA GTT					
N D I S D L R P L A N L T Q M Y S L					
1143	1152	1161	1170	1179	1188
TGC GTT TGG GAG GTA ATT CGA ATA TTA GTG ATT TAA ACC CAG TGC GAA ATA TGA					
R L G G N S N I S D L N P V R N M T					
1197	1206	1215	1224	1233	1242
CGC GTT TGA ATA ATT TAG AAG TAA CAG GGT CTA TAT TAA AAG ATT TGA CGC CGC					
R L N N L E V T G S I L K D L T P L					
1251	1260	1269	1278	1287	1296
TAG CCG ATG TAA CCA GCC TAA CTC GTT TAA CAT TGA GTG ACA ATC AAA TTG AAG					
A D V T S L T R L T L S D N Q I E D					
1305	1314	1323	1332	1341	1350
ATT TAA GTC CAC TAG CTG GCT TGA CAA AAT TGG GCA ATA TAG CAG CAT ATT CGA					
L S P L A G L T K L G N I A A Y S N					

1359	1368	1377	1386	1395	1404
ATA AAA TCA CTG	ATA TTA CTC	CTG TGA CCA	ATT TAA CAA	GAC TCC AGT	ATT TGG
---	---	---	---	---	---
K I T D	I T P V	T N L T	R L Q Y	L D	
1413	1422	1431	1440	1449	1458
ATT TAG GTA	GTA ATG AAA	TCA CTG ATT	TAA GTC CTG	TGG CTA ATC	TGC AAA AAT
---	---	---	---	---	---
L G S N	E I T D	L S P V	A N L Q	K L	
1467	1476	1485	1494	1503	1512
TAA CCT CGC	TAC ATC TTG	CAA ACA ACC	AGA TTA CTA	ATA TTA GTA	TGC TTG AAG
---	---	---	---	---	---
T S L H	L A N N	Q I T N	I S M L	E D	
1521	1530	1539	1548	1557	1566
ATT TAA CAA	ATT TAA CTT	CGT TGG GTT	TAC AAA ACA	ATA AAA TTA	GTG ATA TAT
---	---	---	---	---	---
L T N L	T S L G	L Q N N	K I S D	I S	
1575	1584	1593	1602	1611	1620
CCG TTT TGA	AAA ATC TAA	CCC ATG TGA	CTT ATT TGC	AGT TGG GGT	ATA ACC AAA
---	---	---	---	---	---
V L K N	L T H V	T Y L Q	L G Y N	Q I	
1629	1638	1647	1656	1665	1674
TAG TGG ATG	TGA AAA TAA	TCG GAG GAC	TAA CTA ATT	TAA CAA GTT	TGC AGT TAA
---	---	---	---	---	---
V D V K	I I G G	L T N L	T S L Q	L T	
1683	1692	1701	1710	1719	1728
CAC AAA ACC	ATA TTA CTG	ACA TAA GTC	CTT TAG CCA	ACT TAA CCA	AAA TAC AAT
---	---	---	---	---	---
Q N H I	T D I S	P L A N	L T K I	Q Y	
1737	1746	1755	1764	1773	1782
ACT CTG ACT	TCT CTA ATC	AGA TGA TAA	CAA ATC TAG	AAC GTA ATT	TTT CGA AGA
---	---	---	---	---	---
S D F S	N Q M I	T N L E	R N F S	K T	
1791	1800	1809	1818	1827	1836
CAC TCT CCG	TTC CGA ACA	ATA TAA CTA	GCA TAG ATG	GAA CGC TAA	TTG CGC CTG
---	---	---	---	---	---
L S V P	N N I T	S I D G	T L I A	P E	
1845	1854	1863	1872	1881	1890
AAA CGA TTA	GCA ATA ATG	GAA CCT ACG	ACG CAC CGA	ACT TGA AGT	GGT CTT TAC
---	---	---	---	---	---
T I S N	N G T Y	D A P N	L K W S	L P	
1899	1908	1917	1926	1935	1944
CGA ACT ATT	TAC CAG AAG	TTA AAT ATA	CGT TCA GCC	AAA AAA TAC	CGA TTG GGA
---	---	---	---	---	---
N Y L P	E V K Y	T F S Q	K I P I	G T	
1953	1962	1971	1980	1989	1998
CAG GCA CAA	GTA ATT ATA	GTG GCT TCA	TAA CAC AAC	CGT TAA AAG	AAT TAC TAG
---	---	---	---	---	---
G T S N	Y S G F	I T Q P	L K E L	L D	

2007			2016			2025			2034			2043			2052		
ATT	ACA	AAG	TCA	CAT	TTA	ATG	TAG	AAG	GTA	ATA	CAA	GTG	AAG	TAG	AGA	CTG	TAA
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Y	K	V	T	F	N	V	E	G	N	T	S	E	V	E	T	V	T
2061			2070			2079			2088			2097			2106		
CAG	AAG	GAA	ATC	TCA	TTC	CAG	AAC	CTA	CGA	GCC	CAA	CCA	AAC	AAG	GTT	ATA	CAT
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
E	G	N	L	I	P	E	P	T	S	P	T	K	Q	G	Y	T	F
2115			2124			2133			2142			2151			2160		
TTG	ATG	GTT	GGT	ACG	ACG	CGG	AAA	CAG	GCG	GAA	CAA	AAT	GGG	ACT	TCA	CAA	CCG
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
D	G	W	Y	D	A	E	T	G	G	T	K	W	D	F	T	T	G
2169			2178			2187			2196			2205			2214		
GGC	AAA	TGC	CTG	CAA	ATG	ACC	TCA	CAC	TAT	ATG	CCC	ATT	TTT	CCG	TAA	ATA	GCT
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Q	M	P	A	N	D	L	T	L	Y	A	H	F	S	V	N	S	Y
2223			2232			2241			2250			2259			2268		
ACC	AAG	CAA	ATT	TTG	ATA	TAG	ACG	GTG	TGG	TAA	CGA	ATG	AAG	CGG	TAG	TAT	ACG
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Q	A	N	F	D	I	D	G	V	V	T	N	E	A	V	V	Y	D
2277			2286			2295			2304			2313			2322		
ATA	CCT	TAC	TCA	ATG	AAC	CGA	CCA	CTC	CAA	CCA	AAC	AAG	GCT	ATA	CAT	TTG	ATG
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
T	L	L	N	E	P	T	T	P	T	K	Q	G	Y	T	F	D	G
2331			2340			2349			2358			2367			2376		
GCT	GGT	ATG	ACG	CAG	AAA	CAG	GCG	GTA	ATA	AGT	GGG	ATT	TCA	AAA	CAA	TGA	AAA
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
W	Y	D	A	E	T	G	G	N	K	W	D	F	K	T	M	K	M
2385			2394			2403			2412			2421			2430		
TGC	CCG	CGA	ATG	ATG	TTG	CTT	TTT	ATG	CAC	ATT	TTA	CTA	TCA	ACA	ACT	ATC	AAG
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
P	A	N	D	V	A	F	Y	A	H	F	T	I	N	N	Y	Q	A
2439			2448			2457			2466			2475			2484		
CAA	ATT	TTG	ATA	TAG	ATG	GTG	AGG	TAA	AGA	ATG	AAA	CGA	TAG	CAT	ACG	ATA	CCT
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
N	F	D	I	D	G	E	V	K	N	E	T	I	A	Y	D	T	L
2493			2502			2511			2520			2529			2538		
TAC	TCA	ATG	AAC	CGA	CCA	CTC	CAA	CCA	AAC	AAG	GTT	ATA	CAT	TTG	ATG	GTT	GGT
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
L	N	E	P	T	T	P	T	K	Q	G	Y	T	F	D	G	W	Y
2547			2556			2565			2574			2583			2592		
ATG	ACG	CAG	AAA	CAG	GCG	GAA	CGA	AGT	GGG	ATT	TCA	AAA	CGA	AGG	AAA	TGC	CCG
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
D	A	E	T	G	G	T	K	W	D	F	K	T	K	E	M	P	A
2601			2610			2619			2628			2637			2646		
CGA	ATG	ATG	TCA	CTC	TAT	ATG	CAC	ATT	TTA	CCA	TCA	ACA	ACT	ACC	AAG	CGA	ACT
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
N	D	V	T	L	Y	A	H	F	T	I	N	N	Y	Q	A	N	F



2655	2664	2673	2682	2691	2700
TTG ATA TAG ATG GGG CAG TAA CAG AGG AAG TAG TAA ACT ATG ACG CGC TTA TTC					
---	---	---	---	---	---
D I D G A V T E E V V N Y D A L I P					
2709	2718	2727	2736	2745	2754
CTG AAC CAA CAT CAC CGT CCA AAA CGG GAT TTA CTT TCG AAG GTT GGT ATG ACG					
---	---	---	---	---	---
E P T S P S K T G F T F E G W Y D A					
2763	2772	2781	2790	2799	2808
CAG AAG TTG GCG GAA CAA AAT GGG ATT TTA AAA CGA TGA AAA TGC CTG CGA ACG					
---	---	---	---	---	---
E V G G T K W D F K T M K M P A N D					
2817	2826	2835	2844	2853	2862
ATA TTA CTT TGT ACG CAC ATT TCA GTA AGG AAA CAC CAA TTA TTC CTA GTC CAG					
---	---	---	---	---	---
I T L Y A H F S K E T P I I P S P D					
2871	2880	2889	2898	2907	2916
ATG AAG GAT TAG ACT CTG ATT CTA CCA ATG GAC CAA TTA CTA TAA ATG AAC CGA					
---	---	---	---	---	---
E G L D S D S T N G P I T I N E P S					
2925	2934	2943	2952	2961	2970
GTG CTA CTA GTA CGC CAT CCC AAA ATA ATA ACA TCA CAG TAA CAG CAG GGG AAA					
---	---	---	---	---	---
A T S T P S Q N N N I T V T A G E N					
2979	2988	2997	3006	3015	3024
ATA CTA CAG AAC TAG CAA CAG CTA AAC TTC CAA AAA CTG GAG ATA ATG CCC CGT					
---	---	---	---	---	---
T T E L A T A K L P K T G D N A P W					
3033	3042	3051	3060	3069	3078
GGA AAA CAT TGT TTG CCG GGA TAT TAC TTT CAT CAT CCG CGT TTT ATA TTT GGA					
---	---	---	---	---	---
K T L F A G I L L S S S A F Y I W R					
3087	3096	3105	3114	3123	3132
GAA AAA AAG CAT AAT TAA AAA ACC CAG CAT TTT CTA AAA TGG AGA GTG CTG GGT					
---	---	---	---	---	---
K K A *					
3141	3150	3159	3168	3177	3186
TTT TGG TTT AAT CAA GAA TCT CAA TAT AGC CTT CTG TAC CAT TGA TGC GAA TTT					
---	---	---	---	---	---

## Gesamte Sequenz der intergenische Region zwischen den *ascB*- und *dapE*- Gene bei *Listeria innocua*


*ascB* und *dapE* = Haushaltsgene

☆ Stop codon

5'	CA	ATT	GCT	GAC	GGC	GTA	GAT	TTA	ATG	GGT	TAC	ACA	AGC	TGG	GGT	CCA	ATC	GAC
	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	X	I	A	D	G	V	D	L	M	G	Y	T	S	W	G	P	I	D
	CTA	GTA	AGT	GCC	TCC	ACA	AGC	GAA	ATG	TCC	AAA	CGT	TAC	GGC	TTC	ATC	TAC	GTA
	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	L	V	S	A	S	T	S	E	M	S	K	R	Y	G	F	I	Y	V
	GAC	CAA	GAT	GAC	TGG	GGC	AAA	GGA	ACA	TTA	GAA	CGC	TCC	CGC	AAA	GAT	TCA	TTC
	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	D	Q	D	D	W	G	K	G	T	L	E	R	S	R	K	D	S	F
	TTC	TGG	TAT	AAA	AAA	GTA	ATT	GAA	ACA	AAT	GGT	GAA	GAT	TTA	GAT	TAA	TTG	AAA
	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	F	W	Y	K	K	V	I	E	T	N	G	E	D	L	D	*		
	GTT	AGC	AGT	CCC	GCT	TTG	GCG	GGG	CTG	TTT	TTT	ATT	TTT	ATA	TCA	ATT	AAT	GGG
	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	ATG	AGA	GCT	AAG	ATA	ACC	CCC	GGG	ATA	TAT	AGT	GAT	GTA	GAC	GTT	TGC	CTT	TTT
	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	CCA	TAA	CGG	GAA	AAC	ATA	GGA	TGG	AAT	TCA	AAG	AAA	GAG	GGC	GTA	AAC	ATG	GAA
	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
																	M	E
	CGA	GAA	AGA	AAA	ATT	CAA	ATC	TTA	AAG	GAC	ATT	GTG	AAT	ATT	GAT	TCG	ACT	AAT
	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	R	E	R	K	I	Q	I	L	K	D	I	V	N	I	D	S	T	N
	GGG	CAT	GAG	GAA	CAG	GTT	GCG	AAC	TAC	TTA	CAG	AAG	TTG	TTT	GCT	GAG	TAT	GGT
	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	G	H	E	E	Q	V	A	N	Y	L	Q	K	L	F	A	E	Y	G
	ATT	GAG	TCT	GAA	AAG	GTG	CAA	TAT	GAT	GTA	GAC	CGA	GCT	AGT	CTT	GTT	AGT	GAA
	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	I	E	S	E	K	V	Q	Y	D	V	D	R	A	S	L	V	S	E

ATT	GGT	549	TCT	AAT	GAT	558	GGC	AAA	GTT	567	TTG	GCG	TTT	576	TCA	GGG	CAT	585	ATG	GAT	GTG	594	GTT
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
I	G	S	N	D	G	K	V	L	A	F	S	G	H	M	D	V	V						
GAT	GCT	603	GGC	GAT	GTA	612	TCT	AAA	TGG	621	AAG	TTC	CCG	630	CCT	TTT	GAA	639	GCA	ACG	GAG	648	CAT
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
D	A	G	D	V	S	K	W	K	F	P	P	F	E	A	T	E	H						
GAA	GGG	657	AAA	ATA	TAC	666	GGA	CGT	GGC	675	GCG	ACG	GAT	684	ATG	AAA	TCA	693	GGT	CTA	GCG	702	GCG
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
E	G	K	I	Y	G	R	G	A	T	D	M	K	S	G	L	A	A						
ATG	GTT	711	ATT	GCA	ATG	720	ATT	GAG	CTT	729	CAT	GAA	GAA	738	AAA	CAA	AAA	747	CTA	AAC	GGT	756	AAA
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
M	V	I	A	M	I	E	L	H	E	E	K	Q	K	L	N	G	K						
ATT	AAA	765	TTA	TTA	GCA	774	ACA	GTT	GGT	783	GAA	GAA	GTC	792	GGT	GAA	CTT	801	GGA	GCT	GAA	810	CAA
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
I	K	L	L	A	T	V	G	E	E	V	G	E	L	G	A	E	Q						
CTA	ACG	819	CAA	AAA	GGT	828	TAC	GCA	GAT	837	GAT	TTA	GAT	846	GGC	TTG	ATT	855	ATC	GGC	GAA	864	CCG
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
L	T	Q	K	G	Y	A	D	D	L	D	G	L	I	I	G	E	P						
AGC	GGA	873	CAC	AGA	ATC	882	GTT	TAT	GCG	891	CAT	AAA	GGT	900	TCC	ATC	AAT	909	TAT	ACC	GTT	918	AAA
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
S	G	H	R	I	V	Y	A	H	K	G	S	I	N	Y	T	V	K						
TCC	ACT	927	GGT	AAA	ATG	936	CGC	ATA															
---	---	---	---	---	---	---	---	---															
S	T	G	K	M	R	I																	

## Promotor-Region des *inlA*-Genes in *L. monocytogenes* EGD-e<sup>1</sup>

 PprfA-Box

```

GGAGTGACATGCTTTTTTAACAAAAATTCTCACACCCTTATGTGTTATTTTGAACATAAAG
1  -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 80
CCTCACTGTACGAAAAATTGTTTTTAAGAGTGTGGGAATACACAATAAAACCTGTATTTT
      PprfA-Box
GGTAGAGGATTAACATAAGTTAATTCTTTTTTTTTGGAAAAATAGTTATTATTATTTAATGG
81  -----+-----+-----+-----+-----+ 140
CCATCTCCTATTGTATTCAATTAAGAAAAAAAACCTTTTTATCAATAATAATAAATTACC

GCTTTGAAAGGGGTGATGATATAGAAGAAGTGAAAAAAGAGAGTTTGGCGGTAAGAGTG
141 -----+-----+-----+-----+-----+ 200
CGAAACTTTCCCCACTACTATATCTTCTTCACTTTTTTCTCTCAAACCGCCATTCTCAC

CGGGGCTTGAATTCGTCAATAATAGACCATTTTAAAAGGTGGAATGACACGTGTGATATC
201 -----+-----+-----+-----+-----+ 260
GCCCCGAACCTTAAGCAGTTATTATCTGGTAAAAATTTCCACCTTACTGTGCACACTATAG

AACATAAAATGATTTGCATGATTGAATTCCTATTAAGCTTCGATAGTGAAATACATAAAA
261 -----+-----+-----+-----+-----+ 320
TTGTATTTTACTAAACGTACTAACTTAAGGATAATTCGAAGCTATCACTTTATGTATTTT

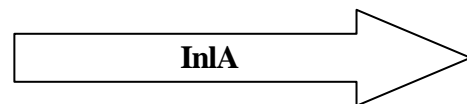
ATATTATATATAGGAAAAATGTGCTGGAACGAACGAGATGAAGGATATCACTAAACGGCT
321 -----+-----+-----+-----+-----+ 380
TATAATATATATCCTTTTTTACACGACCTTGCTTGCTCTACTTCCTATAGTGATTTGCCGA

CCGTAGACAGATTAGCTACTAAATACCATAGGAACAATTTATGGGGAGCATAATTTAATA
381 -----+-----+-----+-----+-----+ 440
GGCATCTGTCTAATCGATGATTTATGGTATCCTTGTTAAATACCCCTCGTATTAAATTAT

AATTAAGCAGACATGATTTTTTCGGATGCAGGAGAAAAATCCTATACAACGAAACCTGATAT
441 -----+-----+-----+-----+-----+ 500
TTAATTCGTCTGTACTAAAAAGCCTACGTCCTCTTTTAGGATATGTTGCTTTGGACTATA

TGTTTCTAACTATTGAAAAAGGAGTGTATATAATGAGAAAAAACGATATGTATGGTTGA
501 -----+-----+-----+-----+-----+ 560
ACAAAGATTGATAACTTTTTCTCACATATATCACTCTTTTTTTTGCTATACATACCAACT
      M R K K R Y V W L

```



<sup>1</sup> Gesamte Sequenz unter „accession number“= [AJ012347](#)

### **Alignmentanalyse (Clustal) alle bis jetzt bekannte Internalinproteinen innerhalb *Listeria monocytogenes***

[illegible]



Majority	- - - - - L A G L S N L Q V L Y L D N M Q I T D I T P L A G L T M L																																																																																																													
	260																									270																									280																									290																									300									
InlA	G	I	L	T	N	L	D	E	L	S	L	N	G	N	Q	L	K	D	I	G	T	L	A	S	L	T	N	L	T	D	L	D	L	A	N	N	Q	I	S	N	L	A	P	L	S	G	L	T	K	L	297																																																											
InlC (Irp8)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	I	P	S	A	C	L	S	R	L	F	L	D	N	N	E	L	R	D	T	D	S	L	I	H	L	K	N	L	164																																																											
InlB	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	L	V	H	L	P	Q	L	E	S	L	Y	L	G	N	N	K	I	T	D	I	T	V	L	S	R	L	T	K	L	184																																																										
InlD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	L	A	G	L	S	N	L	Q	V	L	Y	L	D	L	N	Q	I	T	N	I	S	P	L	A	G	L	T	M	L	183																																																										
InlC2-Dramsi	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	L	A	G	L	S	N	L	Q	V	L	Y	L	D	L	N	Q	I	T	N	I	S	P	L	A	G	L	T	M	L	184																																																										
InlF	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	144																																																													
InlE-Dramsi	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	L	A	G	L	S	N	L	Q	V	L	N	L	D	I	N	Q	I	T	D	I	T	P	L	A	G	L	S	N	L	181																																																										
InlE	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	L	A	G	L	S	N	L	Q	V	L	N	L	D	I	N	Q	I	T	D	I	T	P	L	A	G	L	S	N	L	181																																																										
InlD-Dramsi	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	V	S	G	L	K	N	L	V	G	L	G	I	D	N	N	K	I	S	D	L	S	P	I	S	G	L	S	K	L	285																																																										
InlG	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	L	A	G	L	T	K	L	D	N	I	A	A	Y	S	N	K	I	T	D	I	T	P	L	A	G	L	T	R	L	295																																																										
Majority	Q F L S L G S N Q I S D L T P L A N L S K L T T L D L D N M K I S D I S P L A - L - N L T E V - L -																																																																																																													
	310																									320																									330																									340																									350									
InlA	T	E	L	K	L	G	A	N	Q	I	S	N	I	S	P	L	A	G	L	T	A	L	T	N	L	E	L	N	E	N	Q	L	E	D	I	S	P	I	S	N	L	K	N	L	T	Y	L	T	Y	347																																																												
InlC (Irp8)	E	I	L	S	I	R	N	N	K	L	K	S	I	V	M	L	G	F	L	S	K	L	E	V	L	D	L	H	G	M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	194																																																											
InlB	D	T	L	S	L	E	D	N	Q	I	S	D	I	V	P	L	A	G	L	T	K	L	Q	N	L	Y	L	S	K	M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	218																																																											
InlD	Q	Y	L	S	I	G	N	A	Q	V	S	D	L	T	P	L	A	N	L	S	K	L	T	T	L	K	A	D	D	N	K	I	S	D	I	S	P	L	A	S	L	P	N	L	I	E	V	H	L	K	234																																																											
InlC2-Dramsi	Q	Y	L	S	I	G	N	A	Q	V	S	D	L	T	P	L	A	N	L	S	K	L	T	T	L	K	A	D	D	N	K	I	S	D	I	S	P	L	A	S	L	P	N	L	I	E	V	H	L	K	234																																																											
InlF	T	F	V	Q	L	S	I	M	Q	I	K	D	V	T	P	L	A	N	L	T	K	L	N	Y	L	D	L	R	E	M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	178																																																											
InlE-Dramsi	Q	F	L	S	F	G	S	T	Q	V	S	D	L	T	P	L	A	N	L	S	K	L	T	T	L	N	A	M	N	S	K	V	S	D	V	S	P	L	T	G	L	S	N	L	T	E	V	Y	L	E	236																																																											
InlE	Q	F	L	S	F	G	S	T	Q	V	S	D	L	T	P	L	A	N	L	S	K	L	T	A	L	N	A	M	N	S	K	V	S	D	V	S	P	L	T	G	L	S	N	L	T	E	V	Y	L	E	236																																																											
InlD-Dramsi	N	H	L	T	A	D	S	N	Q	I	S	D	L	R	F	L	S	N	L	A	A	M	E	V	M	R	L	D	G	N	Q	I	S	D	V	T	P	I	A	N	L	A	M	N	Y	V	F	L	A	236																																																												
InlG	Q	Y	L	D	L	G	S	N	E	I	T	D	L	S	P	V	A	N	L	Q	K	L	T	S	L	H	L	A	N	Q	I	T	N	I	S	M	L	E	D	L	T	N	L	T	S	L	G	L	Q	306																																																												
Majority	- -																																																																																																													



Majority	L	T																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																			
	510 520 530 540 550																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																				
InlA	L	K	A	I	F	N	V	K	F	H	V	D	G	K	-	-	-	E	T	T	K	E	V	E	A	G	N	L	L	T	E	P	A	K	P	V	K	E	G	H	T	F	V	G	W	F	D	A	Q	T	540																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																		
InlC (IrpA)	I	K	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	296																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																				
InlB	L	K	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	320																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																					
InlD	L	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	342																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																					
InlC2-Drams	L	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	342																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																					
InlF	I	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	277																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																					
InlE-Drams	L	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	340																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																					
InlE	L	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	340																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																					
InlD-Drams	L	H	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	261																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																					
InlG	L	K	E	L	L	D	Y	K	V	T	F	N	V	E	G	N	T	S	E	V	E	T	V	T	E	E	N	L	I	P	E	P	T	S	P	T	K	Q	G	Y	T	F	D	G	W	Y	D	A	E	T	502																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																		
Majority	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

[illegible]



**Features of Internalin A (InlA)**

MRKKRYVWLKSILVAILVFGSGVWINTSNGTNAQA-35	signal peptide
ATITQDTPINQIFTDGSSSEKMKTVLGKTNVTDTVSQTDLD-76	spacer
QVTTLQADRLGIKSIDGLELYLN	repeat I; 01. LRR
NLTQINFSSNNQLTDITPLKDLT	repeat I; 02. LRR
KLVDILMNNQIADITPLANLT	repeat I; 03. LRR
NLTGLTLFNNQITDIDPLKNLT	repeat I; 04. LRR
NLNRLELSSNTISDISALSGLT	repeat I; 05. LRR
NLQQLSFG-NQVTDLKPLANLT	repeat I; 06. LRR
TLERLDISSNKVSDISVLAKLT	repeat I; 07. LRR
NLESLIATNNQISDITPLGILT	repeat I; 08. LRR
NLDELSLNGNQLKDIGTLASLT	repeat I; 09. LRR
NLTDLDLANNQISNLAPLSGLT	repeat I; 10. LRR
KLTELKLGANQISNISPLAGLT	repeat I; 11. LRR
ALTNLELNENQLEDISPISNLK	repeat I; 12. LRR
NLTYLTLYFNNISDISPVSSLT	repeat I; 13. LRR
KLQRLFFYNNKVSDVSSLANLT	repeat I; 14. LRR
NINWLSAGHNQISDLTPLANLT	repeat I; 15. LRR
RITQLGLNDQAWTNAP-423	
NYKANVSIPNTVKNVTGALIAPATISDGGSYAEPDITWNLPSTNEVSYTFSQPVTIGK	spacer
GTTTFSGTQPLKAIFNAKFHVDGKETTKVEEAGN-517	
LLTEPAKPVKEGHTFVGWFDAQTGGTKWNFSTDKMPTNDINLYAQFSINSYTATFENDGVTTTSQTVDYQG	repeat II; 01.
LLQEPTPPTKEGYTFKGWYDAKTGGDKWDFATSKMPAKNITLYAQYSANSYTATFDVDGKSTTQAVDYQG	repeat II; 02.
LLKEPKAPTKAGYTFKGWYDEKTDGKKWDFATDKMPANDITLYAQFTKN-706	repeat II; 03.
PVAPPTTGGNTPTTNNGGNTTPPSANIPGSDTSNTSTGNSASTTSTMNAYDPYNSKEAS	membrane anchor
LPTTGDSNALYLLLGLLAVGTAMALTKKARASK-800	

**Features of Internalin B (InlB)**-----  
MKEKHNP RRKYCLISGLAII FSLWIIIGNGAKVQA-35signal peptide  
-----

ETITVSTPIKQIFPDDAFAETIKDNLKKKSVTDAVTQNELN-76

spacer  
-----

SIDQIIANNSDIKSVQGIQYLP

repeat I; 01. LRR

NVTKLFLNGNKLT DIKPLTNLK

repeat I; 02. LRR

NLGWLFLDENKIKDLSSLKDLK

repeat I; 03. LRR

KLKSLSL EHNGLSDINGLVHLP

repeat I; 04. LRR

QLESLYLGNNKITDITVLSRLT

repeat I; 05. LRR

KLDTL SLEDNQISDIVPLAGLT

repeat I; 06. LRR

KLQNL YLSKNHISDLRALAGLK

repeat I; 07. LRR

NLDVLELFSQ-240  
-----

ECLNKP INHQSNLVVPNTVKN TDGSLVTPEII SDDGDYEKPNVKWHLPEF

C-terminal domain  
-----

TNEVSFIF YQPVTIGKAKARFHGRVTQPLKEVYTVSYD VDGTVIKTKVEAG

TRITAPKPP TKQGYVFKGWYTEKNGGHEWNFN TDYMSGNDFTL YAVFKAET

TEKTVNL TRYVKYIRGNAGIYKLPREDNSLKQGT LASHRCKALTVDREARN

GGKLWYRLKNIGWTKAENLSLD RYDKMEYDKGVTAYARVRNASGNSVWTKP

YNTAGAKHV NKL SVYQGNMRILREAKTPIT TWYQFSIGGKVIGWVDTRAL

NTFYKQSMEKPTRLTRYVSANKAGESYYKVPVADNPVKRGT LAKYKNQKLI

VDCQATIEGQLWYRIRTSSTFIGWTKAANLRAQK-630  
-----

**Features of Internalin C (Internalin-related protein A, IrpA)**

MLKKNNWLQNAVIAMLVLIVGLCINMGSGTKVQA-34	signal peptide
ESIQRPTPINQVFPDPGLANAAKQNLGKQSVTDLVSQKELS-76	spacer
GVQNFNGDNSNIQSLAGMQFFT	repeat I; 01. LRR
NLKELHLSHNQISDLSPLKDLT	repeat I; 02. LRR
KLEELSVNRNRLKNLNGIPSAC	repeat I; 03. LRR
-LSRLFLDNNELRDTDSLHLK	repeat I; 04. LRR
NLEILSIRNNKLKSIVMLGFLS	repeat I; 05. LRR
KLEVLDLHGNEITNTGGLTRLK	repeat I; 06. LRR
KVNWIDLTGQ-216	
KCVNEPVKYQPELYIANAVKDPDGRWISPYYSISNGGSYVDGCVLWELPV	C-terminal domain
YTDEVSYKFSEYINVGETEAIFDGTVTQPIKN-297	

**Features of Internalin D (548 aa)**

MKKRWNSVFKLVLMVAAILGISLYVTTSQGVEVRA-35	signal peptide
ESITQPTAINVIFPDPALANAIAAGKSNVTDTVTQADLD-76	spacer
GITTLSAFGTGVTTIEGVQYLN	repeat I; 01. LRR
NLIGLELKDNQITDLTPLKNLT	repeat I; 02. LRR
KITELELSGNPLKNVSAIAGLQ	repeat I; 03. LRR
SIKTLDLTSTQITDVTPLAGLS	repeat I; 04. LRR
NLQVLYLDLNQITNISPLAGLT	repeat I; 05. LRR
NLQYLSIGNAQVSDLTPLANLS	repeat I; 06. LRR
KLTTLKADDNKISDISPLASLP	repeat I; 07. LRR
NLIEVHLKNNQISDVSPANTS	repeat I; 08. LRR
NLFIVTLTNQTITN-266	
QPVFYQNNLVVPNVVKGPSGAPIAPATISDNGTYASPNLTWNLTSTFINNVSYTFNQSVTFKN	spacer
TTVPFSGTVTQPLTEAYTAVFDVDGKQTSVTVGANE-364	
LIKEPTAPTKEGYTFTGWYDAKTGGTKWDFATDKMPAEDITLYAQFTINSYTATFDIDGKLTTQKVITYQS	repeat II; 01.
LLEEVAPTCKDGYTFTGWYDAKTGGTKWDFATGKMPAGNITLYAQFTKNDNPNPDPTTNTPTGNGDGTS-504	repeat II; 02.
NPSNSGGNTTLPTAGDENTMLPIFIGVFLLGATLILRKTIVK-548	membrane anchor

**Features of Internalin E (499 aa)**

MKRNKTALRILVTLAVVLA-19	signal peptide
ITFWVGMSSKEVQAAVIEHPTPINGNFTDPVLTDNVKTLGKADVTDEVTQTDLD-74	spacer
SVTHLSAKSAGITTIEGLQYLT	repeat I; 01. LRR
NLSELELIDNQVTDLNPLTNLT	repeat I; 02. LRR
KITELRLSGNPLKDVSALAGLK	repeat I; 03. LRR
NLKTMDLIYTDITDVTPLAGLS	repeat I; 04. LRR
NLQVLNLDINQITDITPLAGLS	repeat I; 05. LRR
NLQFLSFGSTQVSDLTPLANLS	repeat I; 06. LRR
KL TALNAMNSKVSDVSPLTGLS	repeat I; 07. LRR
NLTEVYLEENQISDVSP LAKLP	repeat I; 08. LRR
NLSIVTLTNQTITN-264	
QPVFYQNKPIVPNVVTGLSGELIAPDTISDNGTYTSPNLTWDLNSFINSVSYTFNQSVTFKN	spacer
TTVPFSGTVTQPLTEVYAVVFDVDGEQTSAMVGVNE-362	
LINEPTAPAKEGYIFDGWYDAKTGKNKWDFGIDKMPASDITLYAKFT	repeat II'; 01.
ENEENASSPINVEPNDNNS	repeat II'; 02.
DNAEPNASSSNVQENG TNE-449	repeat II'; 03.
GINNLNSSGEDKVNILPITGDKLNVLPFVVGAVLIGIGLVLFRRKKRQTK-499	membrane anchor

**Features of Internalin F (490 aa)**

MKQRKTSVLHVLLVVTAILG-20	signal peptide
ISLWVNASHGMKAQAESIAQPAPINEIFTDPALADEVKTELGKTSVTDEVTQTDLN-76	spacer
QITKLEADDKGINSIEGIQYLT	repeat I; 01. LRR
NLNMLGVSSNQITNITPLANLT	repeat I; 02. LRR
NLDSLVLGDNKISDVTPLSGLT	repeat I; 03. LRR
QLTFVQLSINQIKDVTPLANLT	repeat I; 04. LRR
KLNYLDLRENQISDASPLVNMT	repeat I; 05. LRR
DLTVLHLEKQQITAAPVV-204	
YQTNLVAPDILKNAYGEVVPPTTISNNGTFASPNITWNLDSFTSEVSDFNQKITLG	spacer
DNGKVTFAGTVVQPIVEAPVNYITTFDVDGTTTTENVVVDV-301	
LITEPAEPTKEGYTFSGWYDAETGGNEWDFAVDKMPATNMITYAQFTINSYTATFDVDGETTNQKVDYQA	repeat II'; 01.
LLQEPTAPTKDGYTFVGWYDAKTGGTEWDFATSKMPTSDITLYARFTKN-420	repeat II'; 02.
PSSDNSQTAPGKDDKNDKDKLTIKANDSADATSTKLPKTSDDSSMIPTILGTLFIGGAILILRKKTNI-490	membrane anchor

**Features of Internalin G (821 aa)**

MKSKNNYFKQITTIMTVVSLIMVLGIQGNNDVKA-35	signal peptide
APQVAPPASINQIFPDADLAEGIRAELOKSSVTDVVTKEELE-77	spacer
SISQLSVYAKKIASIEGLEEYLT	repeat I; 01. LRR
NLKFLNLNGNQITDLSPLSNLT	repeat I; 02. LRR
KLTEIYIGDNKISDISPLQNL	repeat I; 03. LRR
NVTDLYLVDNDISDLRPLANLT	repeat I; 04. LRR
QMYSLRLGGNSNISDLNPVRNMT	repeat I; 05. LRR
RLNNLEVTGSILKDLTPLADVT	repeat I; 06. LRR
SLTRLTLSDNQIEDLSPLAGLT	repeat I; 07. LRR
KLGNIAAYSNNKITDITPVTNLT	repeat I; 08. LRR
RLQYLDLGSNEITDLSPPVANLQ	repeat I; 09. LRR
KLTSLHLANNQITNISMLEDLT	repeat I; 10. LRR
NLTSLGLQNNKISDISVLKNLT	repeat I; 11. LRR
HVTYLQLGYNQIVDVKIIGGLT	repeat I; 12. LRR
NLTSLQLTQNHITDISPLANLT	repeat I; 13. LRR
KIQYSDFSNQMITNL-385	repeat I; 14. LRR
ERNFSKTLSPNNITSIDGTLIAPETISNNGTYDAPNLKWSLPNYLPEVKYTFSSQKIPIGTGTSNYSGFI	spacer
TQPLKELLDYKVTFNVEGNTSEVETVTEGN-479	
LIPEPTSPTKQGYTFDQWYDAETGGTKWDFTTGQMPANDLTLYAHFSVNSYQANFDIDGVVTNEAVVYDT	repeat II'; 01.
LLNEPTTPTKQGYTFDQWYDAETGGNKWDFKTMKMPANDVAFYAHFTINNYQANFDIDGEVKNETIAYDT	repeat II'; 02.
LLNEPTTPTKQGYTFDQWYDAETGGTKWDFKTKEMPANDVTLYAHFTINNYQANFDIDGAVTEEVVNYDA	repeat II'; 03.
LIPEPTSPSKTGFTFEGWYDAEVGGTKWDFKTMKMPANDITLYAHF-735	repeat II'; 04.
SKETPIIPSPDEGLDSDSTNGPITINEPSATSTPSQNNNITVTAGENTTELATAKLPKTGDNAPWKTLFAG	membrane anchor
ILLSSAFYIWRKKA-821	

## ABKÜRZUNGEN

A	Ampere	DTT	Dithiothreitol
A	Adenin	Em	Erythromycin
Abb.	Abbildung	<i>E. coli</i>	Escherichia coli
<i>actA</i>	Stukturgen für Actin	EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Amp	Ampicillin	EtBr	Ethidiumbromid
AMPPD	3-(2'-Spiroadamantan)-4-methoxy-4-(3'-phosphoryloxy)-phenyl-1,2-dioxetan	EtOH	Ethanol
APS	Ammoniumpersulfat	FITC	Fluoresceinisothiocyanat
Aqua dest.	destilliertes Wasser	FKS	fötales Kälberserum
Ap	alkalische Phosphatase	G	Guanin
APS	Ammoniumpersulfat	g	Gramm
As	Aminosäure	GST	Glutathion-S-Transferase
ATP	Adenosintriphosphat	h	Stunde
BCIP	5-Bromo-4-Chloro-indolylphosphate, p-toluidine salt	His	Histidin
<i>bgl</i>	6 Phospho-β-Glukosidase	HIV	human immunodeficiency virus
BHI	Brain Heart Infusion	hly	Strukturgen der Lysteriolysin O
bp	basenpaare	HUSAR	Heidelberg Unix Sequence Analysis Resources
BSA	Bovin Serum Albumin	IFN	Interferon
bzw.	beziehungsweise	IgG	Immunglobulin G
°C	Grad Celcius	Il	Interleukin
C	Cytosin	<i>inl</i>	Strukturgen der Internalin
ca.	circa	IPTG	Isopropyl-β-D-Thiogalactosid
CAMP	Christie, Atkins, Munch-Peterson	Ipa	Invasion plasmid antigen
Da	Dalton	<i>ipaH</i>	Gen für Invasion plasmid antigen H
DapE	succinyl-diaminopimelate Desuccinylase	IPTG	Isopropyl-β-D-Thiogalactosid
d.h.	das heißt	<i>irpA</i>	Strukturgen der „internalin related proteine“
ddNTP	beliebige 2',3'-Dideoxy-Nukleosid-5'-Triphosphate	kb	Kilobasen
Dig	Digoxiginin	l	Liter
DNA	Desoxyribonucleic acid	<i>lacZ</i>	Strukturgen der β-Galactosidase
DNase	Desoxyribonuklease	LB	Luria Bertani
		LiCl	Lithiumchlorid
		LRR	Leucin-reiche repeats

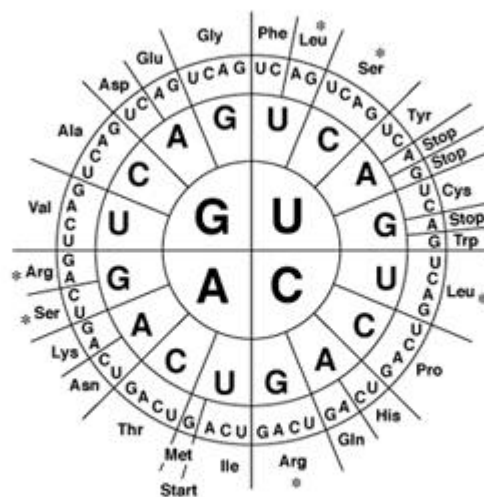


Lsg	Lösung	RBS	Ribosomenbindungsstelle
M	Molar	RNA	Ribonucleic acid
MEM	Minimal Essential Medium	RNase	Ribonuklease
Met	Methionin	rpm	Umdrehung pro Minute
MHC	major histocompatibility complex	RT	Raumtemperatur
m	milli- $10^{-3}$	SDS	Natrium Dodecylsulfat
min	Minute	sec	Sekunde
mpl	Strukturgen der Metalloprotease	spp.	Spezies
mRNA	messenger RNA	T	Thymin
nm	Nanometer	Tab	Tabelle
n	nano- $10^{-9}$	Taq	DNA-Polymerase aus <i>Thermus</i>
nt	Nukleotide		<i>Aquaticus</i>
NTP	Nukleosidtriphosphat	TCA	Trichloracetic acid
OD	Optische Dichte	TEMED	N,N,N,N-Tetramethylendiamin
p	pico- $10^{-12}$	TNF	Tumornekrosefaktor
PAA	Polyacrylamid	Tris	Tris -(hydroxymethyl)-
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese		aminomethan
PCR	Polymerase Chain Reaction	U	Unit
pH	negativer dekadischer	ÜN	über Nacht
	Logarithmus der	UV	Ultraviolett
	Wasserstoffionen-konzentration	V	Volt
<i>plcA</i>	Strukturgen der	VASP	Vasodilatator stimuliertes
	Phosphatidylinositol-spezifischen		Phosphoprotein
	Phospholipase C	Vol	Volumen
<i>plcB</i>	Strukturgen der	W	Watt
	Phosphatidylcholin-spezifischen	YopM	<i>Yersinia</i> outer protein M
	Phospholipase C	X-Gal	5-Bromo-4-Chlor-3-Indoyl-β-D-
<i>prfA</i>	Strukturgen des positiven		Galaktosid
	Regulationsfaktors	X	mal
RAPD	Random Amplification of	z.B.	zum Beispiel
	Polymorphic DNA	μ	mikro- $10^{-6}$

### Symbole für Aminosäuren

A	Ala	Alanin	M	Met	Methionin
B	Asx	Aspargin/Asparaginsäure	N	Asn	Asparagin
C	Cys	Cystein	P	Pro	Prolin
D	Asp	Asparaginsäure	Q	Gln	Glutamin
E	Glu	Glutamin	R	Arg	Arginin
F	Phe	Phenylalanin	S	Ser	Serin
G	Gly	Glycin	T	Thr	Threonin
H	His	Histidin	V	Val	Valin
I	Ile	Isoleucin	W	Trp	Tryptophan
K	Lys	Lysin	Y	Tyr	Tyrosin
L	Leu	Leucin	Z	Glx	Glutamin/Glutaminsäure

### Der genetische Code

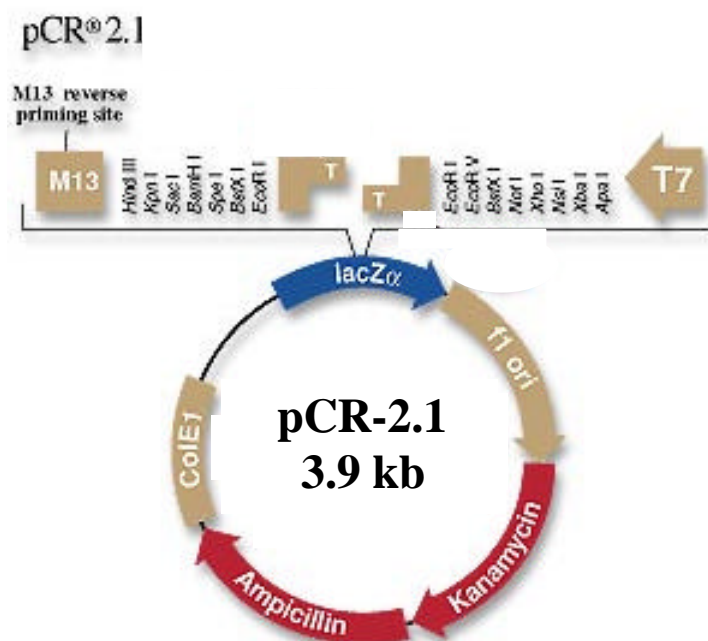


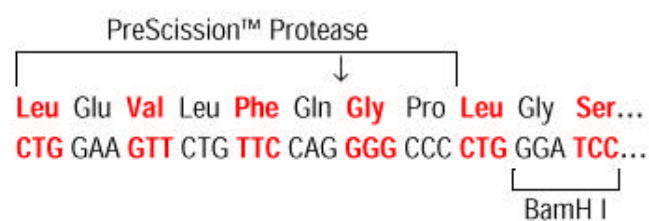
Leserichtung der Codons von innen nach außen

\* Aminosäuren mit Sternchen sind durch 6 Codons spezifiziert

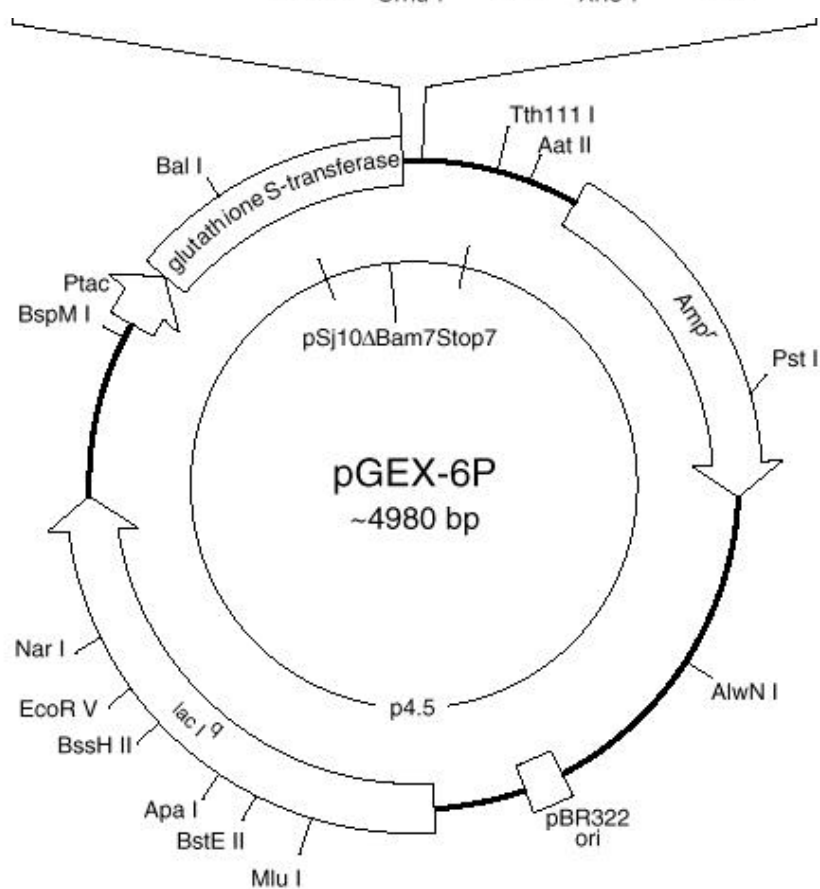
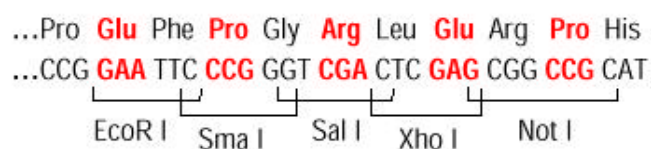
In der gewählten Darstellung werden als Nucleoside die RNA-Bausteine benutzt, da die mRNA als Matrize zur Proteinsynthese dient. Würde man die DNA-Symbolik bevorzugen, so müßte nur Uridin (U) durch Desoxythymidin (T) ersetzt werden.

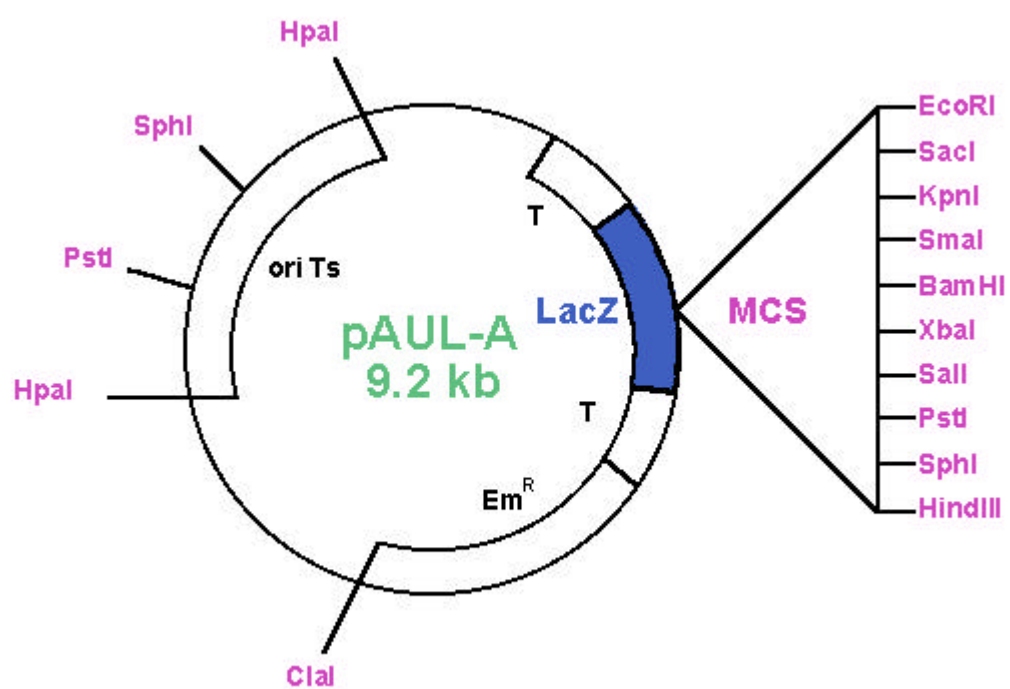
# Vektoren





### pGEX-6P-1 (GenBank U78872)





## **DANKSAGUNGEN**

Die vorliegende Doktorarbeit wurde im Institut für Medizinische Mikrobiologie des Klinikums der Justus-Liebig-Universität Gießen, das unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Trinad Chakraborty steht, durchgeführt. Ihm gilt mein besonderer Dank sowohl für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und das große Interesse an dieser Arbeit, als auch für die Hilfsbereitschaft innerhalb und außerhalb des Institutes.

Herrn PD Dr. Eugen Domann danke ich für das Thema der vorliegenden Arbeit und die hervorragende wissenschaftliche Betreuung, sowohl während der Diplom- als auch dieser Doktorarbeit.

Herrn Prof. Dr. R. Renkawitz (Institut für Genetik) Biologie danke ich für das Interesse an dieser Arbeit und für die Übernahme des Korreferats, sowohl während der Diplom- als auch dieser Doktorarbeit.

Herrn Dr. Ayub Darji für die Durchführung des hervorragenden Mausinfektionsversuchs.

Herrn PD. Dr. Martin J. Lössner (Institut für Mikrobiologie, Forschungszentrum für Milch und Lebensmittel Weihenstephan, Technische Universität München, Freising) für die Bereitstellung des Lysins.

Mein besonderer Dank gilt Frau Silke Zechel, die mich sowohl während meiner Diplom- als auch meiner Doktorarbeit sehr unterstützt hat.

Bei Frau Sabine Buske, Silvia Krämer, Alexandra Amend, Sonja Otten, bedanke ich mich für ihre Hilfsbereitschaft und die gute Stimmung im Labor, sowie allen weiteren Mitarbeitern des Institutes für Medizinische Mikrobiologie.

Besonders herzlich möchte ich mich bei meiner Frau Rafika bedanken, die mich während meiner gesamten Doktorarbeit bestärkt und viel Geduld gezeigt hat.

Bei meinen Eltern, meinen Geschwistern und allen, die mich während meiner gesamten Doktorarbeit bestärkt haben und die es mir ermöglichten, diese zu absolvieren.

# LEBENS LAUF

## PERSÖNLICHE DATEN

Geboren am 22 Oktober 1965 in Algerien (algerier), Verheiratet (2 Kinder).

## AUSBILDUNGSDATEN

1983-1988	Abschluss in der Biologie (Genetik) an der Universität Oran (Algerien)
1989-1990	Deutschkurs am Institut Benedict Hannover, Abschluss: Mittelstufe II
1990-1991	Deutschkurs an der Justus-Liebig Universität Gießen
1992-1995	Hauptstudium Biologie an der Justus-Liebig Universität Gießen
1995	Diplom in der Biologie erhalten (Diplomarbeit im Inst. Med. Mikrobiologie an der Justus-Liebig-Universität, Giessen)
1996-1999	Promotion am Institut für Med. Mikrobiologie an der Justus-Liebig-Universität Gießen

## QUALIFIKATIONEN

- „Algerisches Diplom im Bereich Genetik, an der Universität Oran, in Algerien.
- Langjährige Betreuung von Praktikanten am Institut für Med. Mikrobiologie an der Justus-Liebig Universität in Giessen.
- „Erfindungsvorschlag an Fraunhofer Patentstelle für die deutsche Forschung „ Entwicklung ein Schüttelinkubator mit Luftheizung zur kontinuierlichen Messung von optischen Dichte “.
- „Erfindung einer neuen Decapsulationsmethode für die Elektroporation von Bakterien.

## PUBLIKATIONEN

- „Ulrich von Both, Sonia Otten, [Abdelhak Darbouche](#), Eugen Domann, Trinad Chakraborty. „ Physical and genetic map of the *Listeria monocytogenes* EGD serotype 1/2 chromosom” In FEMS microbiology Letters 175 (1999) 281-289
- „Peters, C., Domann, E., [Darbouche, A.](#), Chakraborty, T and Mielke, M.E.A. (1999) „ Immunological characterisation of isogenic *Listeria* mutants that regulate induction of host immune responses” (submittet)
- „[Abdelhak Darbouche](#), Silke Zechel, Frank Ebel, Tanja Scheidereit, Thomas Nichterlein, Trinad Chakraborty, and Eugen Domann „ Identification of a Beta-glucosidase Gene in *Listeria monocytogenes* EGD and Characterisation of its gene Products” American Society for Mikrobiology; erhalten: 11/20/98; Article: JB1569-98 (submittet)

## **BERUFSPRAXIS**

2000-2001      Wissenschaftlicher Assistent am Institut für Mikrobiologie und Tierseuchen an der  
Freie-Universität Berlin

## **EDV-KENNTNISSE**

DNAstar, Husar, DNAsis, Word, Excel, Corel Draw, Power Point, FreeHand 8, Win- und  
Mac OS, Internet, data base searching usw.

## **SPRACHKENNTNISSE**

Arabisch in Wort und Schrift  
Französisch in Wort und Schrift  
Deutsch in Wort und Schrift  
Englisch in Wort und Schrift

Berlin, 22. 10. 2001